



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Distribución de la isoforma de salmón de GnRH (sGnRH) en gónadas de  
*Chirostoma humboldtianum*

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

Presenta:

LUZ MARÍA TORIBIO HERNÁNDEZ

Director de Tesis: Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas.

TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO

2010





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Dedicatoria.**

Dedico este trabajo, a mis hermanos, que son las personas más maravillosas e importantes en mi vida. Sin ustedes este trabajo no hubiese sido posible. Gracias por todo su cariño.

A mis amigas, Anahí, Alejandra, Erika y Beta, con ustedes compartí los mejores momentos de la carrera, quiero agradecerles por todos y cada uno de sus consejos.

## **Agradecimientos.**

Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas, por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo y sobre todo por la confianza que depósito en mí, por todos y cada uno de sus consejos, gracias por el tiempo brindado.

M. en C. Mónica Chávez Maldonado, agradezco toda su ayuda y su tiempo, a la realización de las técnicas requeridas, para este trabajo.

Dra. Juana Alba Luis Díaz, gracias por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Biol. José del Carmen Benítez Flores, por sus sugerencias y comentarios, para enriquecer este trabajo.

Biol. Beatriz Macedo Garzón, por la ayuda, y las observaciones a este trabajo.

## Índice

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>1.Introducción</b>	<b>2</b>
1.1 Aspectos generales	2
1.2 Antecedentes	6
1.2.1 Síntesis de la GnRH	9
1.2.2 Expresión del receptor de GnRH en gónadas de pez	10
1.2.3 Mecanismo de acción de GnRH en ovario	10
1.2.4 Mecanismo de acción de GnRH en testículo	13
1.3 Generalidades de la especie de estudio	15
1.4 Descripción anatómica e histológica del testículo de <i>Chirostoma humboldtianum</i>	17
1.4.1 Características morfológicas de las células del quiste testicular	18
1.4.2 Escala histológica de madurez gonádica del testículo de <i>Chirostoma humboldtianum</i> .	19
1.4.3 Descripción anatómica e histológica del ovario de <i>Chirostoma humboldtianum</i>	21

<b>2. Justificación</b>	<b>25</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>26</b>
<b>4. Materiales y métodos</b>	<b>27</b>
4.1 Obtención del tejido	27
4.2 Procesamiento del tejido	27
4.3 Inmunohistoquímica	28
4.4 Controles	29
<b>5. Resultados</b>	<b>30</b>
<b>6. Discusión</b>	<b>36</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>41</b>
<b>8. Referencias</b>	<b>42</b>

## Resumen

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es una molécula clave en la reproducción, actuando en el sistema nervioso central (SNC) como una hormona neuroendocrina en la liberación de las gonadotropinas y también se ha propuesto que puede tener un papel paracrino-autocrino fuera del SNC. En las gónadas se ha reportado que estimula la gametogénesis y esteroidogénesis. En el presente estudio, se localizó la isoforma de salmón (sGnRH) en gónadas de *Chirostoma humboldtianum*, por inmunohistoquímica. Se observó inmunoreacción, en etapas tempranas e intermedias de la ovogénesis, especialmente, en ovocitos previtelogénicos y en folículos vitelogénicos tempranos en células de la granulosa y teca. En testículo, la presencia de sGnRH se encontró en fases iniciales de la gametogénesis. Específicamente, en espermatogonias y espermatocitos primarios. En *Ch. humboldtianum*, la presencia de sGnRH parece participar en los eventos tempranos de la ovogénesis, debido a que no se encontró el péptido durante las últimas fases del desarrollo del ovocito, mientras que en testículo, podría estar vinculada con el inicio de la meiosis.

# 1. Introducción

## 1.1 Aspectos generales

En peces teleósteos, los sucesos reproductivos implican la acción de un gran número de eventos complejos. Estos, son regulados por el eje hipotálamo – hipófisis - gónada (Fernández – Fernández *et al.*, 2006; Kuo *et al.*,2005; Amano, *et al.*, 2002; Kobayashi,*et al.*,1997 ). Para que la reproducción tenga éxito, es preciso que haya una sincronización de los reproductores entre sí, y de éstos con las variaciones de los factores ambientales. Ésta sincronización permitirá que los individuos maduren simultáneamente y en el momento más idóneo, garantizar una mayor supervivencia de la progenie (Carrillo y Zanuy, 1993). Esta sincronización de los individuos con los factores ambientales resulta de gran importancia en el ciclo reproductivo de los peces teleósteos, que presentan cambios cíclicos en sus niveles hormonales y viven en un medio que experimenta marcadas variaciones estacionales en factores tales como la luz, la temperatura, el oxígeno disuelto, la salinidad, el pH, la disponibilidad de nutrientes, etc. así, cada individuo debe disponer de un sistema que reciba la información procedente, tanto del exterior como del interior del organismo, que las integre y determine el establecimiento de un estado endocrino idóneo, que regule a su vez, todos los eventos fisiológicos que conducirán a la reproducción. Estas complejas funciones se llevan a cabo a través de múltiples interacciones, entre los órganos del cerebro - hipófisis- gónada (Kah *et al.* ,1993).



Estos factores actuarán para que en el momento adecuado se pueda estimular a través de señales a las neuronas que se encuentran en el hipotálamo, principalmente donde se sintetiza y se libera GnRH, y así iniciar la cascada de respuestas del eje reproductivo (Onuma *et al.*, 2005). GnRH constituye el principal factor cerebral implicado en la estimulación de la producción y secreción de las gonadotropinas hipofisarias; se sintetiza especialmente en las células neurosecretoras del área preóptica (POA) e hipotálamo, llegando a la hipófisis e induciendo la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y a la hormona luteinizante (LH) (Sherwood *et al.*, 1993). Ambas hormonas viajan por el torrente sanguíneo hacia las gónadas donde inducen la gametogénesis, y modulan la producción de hormonas esteroideas sexuales (Yu, *et al.*, 1997). La función de ambas gonadotropinas es diferente. En las hembras, la LH estimula fundamentalmente la ovogénesis, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo, así como la síntesis de progesterona; mientras que en machos, participa en la secreción de andrógenos. La FSH, en hembras, induce el crecimiento y maduración de los folículos ováricos y en machos, la espermatogénesis. (Enomoto y Kyun 2004; Millar, 2005; Kaiser *et al.*, 1997).

La familia de las GnRHs, se ha expandido, y actualmente incluye 28 isoformas (Sower *et al.*, 2009). En 1983, se aisló en encéfalos de hembra de salmón (*Onchorhynchus keta*), la primera molécula de GnRH en teleósteos, a la cual se le asignó el nombre de sGnRH, de acuerdo a la nomenclatura convencional en la cual se antepone a las siglas de la hormona, la inicial de la especie en la que se encontró (Sherwood *et al.*, 1983). En *O. keta* y otros salmónidos, la sGnRH se localiza principalmente en los nervios olfativos, bulbos olfatorios, el nervio terminal, el telencéfalo ventral, el área preóptica y el hipotálamo. Además, se

ha demostrado la existencia de esta isoforma en extensiones axonales en la hipófisis (Amano, *et al.*,1991; Kim,*et al.*,1995). De acuerdo con la localización de la sGnRH, reportada para varias especies de teleósteos, en especial, para algunos salmónidos y ciprínidos, se ha establecido que cuando se encuentra en la porción ventral del cerebro anterior, en donde están el telencéfalo ventral, área preóptica y el hipotálamo, su papel es clave en el control de la reproducción funcionando como lo que se ha denominado como sistema GnRH1. En otros teleósteos como los perciformes, originalmente se describió en el nervio terminal y el bulbo olfativo (White *et al.*, 1995), y se le nombró como sistema GnRH3, si bien en estudios posteriores, se ha encontrado que existe una sobreposición entre sistema GnRH3 en el área preóptica e hipotálamo con el sistema GnRH1 (González- Martínez *et al.*, 2002), por lo cual, al menos para este grupo se comienza a aceptar que ambos sistemas participan en la regulación de la reproducción a nivel de adenohipófisis (Zohar *et al.*, 2009)

Además de los sistemas GnRH1 y 3, se presenta en el cerebro medio de todos los vertebrados otra isoforma, la GnRH de pollo II (cGnRH-II) a la cual se le atribuye que puede ser neuromodulador/neurotransmisor aunque su papel está muy poco documentado.

De manera adicional, se acepta que la GnRH desempeña funciones paracrinas/autocrinas, en especial, en los órganos fuera del sistema nervioso en que se ha detectado. En mamíferos la GnRH ha sido encontrada en epitelio olfativo así como en gónadas,(Millar, 2005). De forma particular en gónadas se ha descrito que estimula la gametogenesis, la esteroidogénesis y la apoptosis. (Ishizaki *et al.*, 2004; Millar, 2004;Seafon *et al.*,1997; Kabayashi *et*

*al.*,1997;Givens *et al.*,2004; Amano *et al.*,1995; Whitlock *et al.*,1995). Además la GnRH, en gónadas también tiene un papel clave en la apoptosis, la cual se caracteriza por cambios bioquímicos y morfológicos, así como la condensación de la cromatina, fragmentación del DNA y la formación de cuerpos apoptóticos (Kerr, *et al.*, 1972). Se han realizado estudios en testículo maduro de pez dorado, donde se ha demostrado que dos isoformas de GnRH, (sGnRH y cGnRH-II), presentes en cerebro y gónadas, incrementa la fragmentación de DNA, induciendo apoptosis.

## 1.2 Antecedentes

Uzbekova *et al.*, 2001, analizaron la expresión de sGnRH-1 y sGnRH-2, en gónadas de hembra y macho de trucha arcoiris, en diferentes estadios de la gametogénesis. Por medio de Northern blot demostraron que el mRNA de sGnRH-2, fué la más abundante en testículo y ovario. En testículo mRNA de sGnRH, es altamente expresado antes del inicio de la espermatogénesis (testículos de organismo inmaduros) y desaparece en el estadio II y III (espermatogénesis temprana), hay un incremento progresivo hasta el estadio IV al VI (espermatogénesis media y final). En ovario, la expresión del mRNA de sGnRH es alta en ovocitos previtelogénicos y en vitelogénesis temprana, pero hubo una disminución durante la vitelogénesis tardía. La disminución de la expresión de mRNA de sGnRH, durante el periodo de proliferación espermatogonial en testículo, y un incremento durante la meiosis que ocurre en testículo y ovario, esto sugiere que sGnRH tiene un efecto antiproliferativo y estimula la meiosis durante la gametogenesis. Orguloso

Andreu-Vieyra y Habibi, en 2000. Realizaron estudios, donde se demuestra que la GnRH, también juega un papel paracrino en el control de la apoptosis en el testículo de pez dorado. Esto concuerdan con lo reportado por Pati y Habibi, en el 2000, en donde la GnRH también juega un papel regulador, autocrino / paracrino en ovarios de mamíferos y peces.

En folículos ováricos de pez dorado se han encontrado receptores a GnRH, los que presentan selectividad diferencial a distintos ligandos, como son: sGnRH y cGnRH –II, que pueden inhibir o estimular el desarrollo (Pati y Habibi, 2002).

Uzbekova, *et al.*, 2002, También realizaron estudios de dos isoformas de

GnRH, las cuales se han identificado en: salmón (sGnRH) y pollo II (cGnRH). En este estudio la expresión temporal de los genes de sGnRH-1, sGnRH- 2, cGnRH-II y rtGnRH, se estudiaron en ovario de trucha arcoiris, durante el ciclo reproductivo de acuerdo al estadio del desarrollo folicular. Utilizando RT-PCR y southernblot, la transcripción de sGnRH-1, sGnRH-2, cGnRH-II y rtGnRH, fueron detectadas en ovario temprano de 55-65 días pos fertilización y durante la vitelogénesis, si bien decrece conforme avanza el fenómeno. El mensajero de cGnRH-II fué detectado sólo en ovocitos previtelogénicos. Considerando que en las gónadas de la trucha se detectan diferentes mRNA por proceso de splicing diferencial de sGnRH-1 sGnRH-2, y que no queda claro el significado funcional de ello, es posible que la expresión y la localización de sGnRH, cGnRH y rtGnRH, dependa del estadio, lo cual sugiere que el péptido de GnRH, quizá tenga diferentes papeles en la regulación del desarrollo folicular en ovario. Estos estudios concuerdan con lo reportado por Soverchia, *et al.*, 2007. donde estudiaron el nivel del mRNA de varias isoformas de sGnRH, en machos y hembras, en diferentes áreas en gónadas y los resultados han reportado que la transcripción del mRNA de sGnRH, cGnRH-II y sbGmRH, se expresa localmente durante la diferenciación gonadal de la dorada *Sparus aurata*, La expresión del mRNA de estas tres isoformas de GnRH se detectó en las gónadas que se encontraban cambiando de testículos a ovarios, con lo cual se planteó que la transcripción endógena de GnRH podría estar relacionada con la diferenciación gonadal, en particular con la apoptosis en la degeneración testicular.

Andreu-Vieyra *et al.*, 2005, demostraron que en testículo de *Carassius auratus* , GnRH induce apoptosis, durante una etapa tardía en la espermatogenesis,

mediada por un incremento elevado por las proteínas fas y la fasL, que activan a las caspasas 3 y 8 .

En otros estudios, se analizó la expresión en gónadas de los mRNA de sGnRH -1 y sGnRH-2 en trucha arcoíris, durante diferentes estadios de la gametogenesis. A través de Northern blot se encontró que el mRNA de sGnRH-2 fué el que más se expresó en testículo y ovario. (Andre-Vieyra *et al.*, 2005).

### 1.2.1 Síntesis de la GnRH

La hormona liberadora de gonadotropinas se sintetiza en forma de un precursor que recibe el nombre de prepo-GnRh. Además, los genes de las distintas formas de GnRH presentan una estructura muy conservada a lo largo de la filogenia (Adelman *et al.*,1986; Gothilf *et al.*,1996). Todos estos genes contienen información que codifica para la síntesis de un péptido señal, el propio deca péptido de GnRH, un tripéptido de procesamiento (CAS) y un péptido asociado a cada GnRH, denominado GAP (Figura 1). Del análisis de su estructura y del estudio de su función, se ha deducido que tras la escisión del péptido señal, el residuo de ácido glutámico del aminoácido terminal de la GnRH se cicla para producir ácido piroglutámico. Entonces la GnRH se, separa del GAP al escindirse de los aminoácidos dibásicos del sitio de procesamiento (Lys<sup>12</sup>-Arg<sup>13</sup>) mediante la acción de endopetididasas y la carboxipeptidasas. El grupocarboxilo terminal de la molécula (Gly<sup>10</sup>-Gly<sup>11</sup>) se modifica por acción de la  $\alpha$ -peptidil-glicina monooxigenasa, que amida al grupo carboxilo terminal (Gly<sup>10</sup>-NH<sub>2</sub>) del deca péptido ya activo. A continuación, la GnRH y el GAP se almacenan en gránulos de secreción hasta ser secretados (Wetsel *et al.*, 1991). Algunos estudios sugieren que el GAP inhibe la secreción de prolactina (Nicolics *te al.*, 1985) y estimula la liberación de gonadotropinas (Millar *et al.*, 1986). Actualmente se considera que la función del GAP se limita a péptido de apoyo, y a proporcionar la estructura secundaria adecuada para el procesamiento correcto del precursor de GnRH (Sherwood *et al.*, 1994).

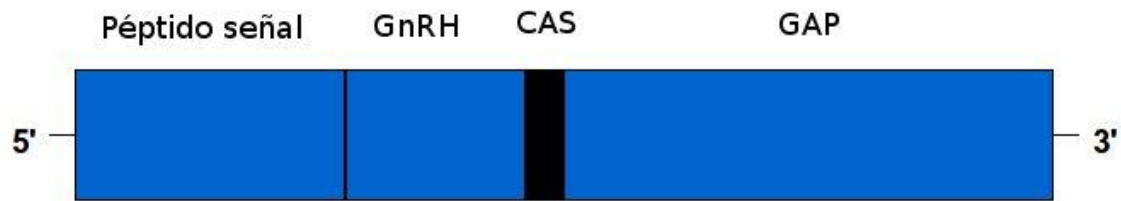


Fig. 1. Organización del cDNA del precursor de GnRH. Este precursor está constituido por un péptido señal, el decapeptido GnRH, un péptido de procesamiento (CAS), y un péptido asociado a la GnRH (GAP).

### 1.2.2 Expresión del receptor de GnRH en gónadas de pez

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) desencadena sus acciones autocrinas/ paracrinas, tras unirse a su receptor (GnRHR), está acoplado a proteínas G que tiene 7 dominios transmembranales, el cuál se encuentra en la membrana de la célula blanco, activando un sistema de segundos mensajeros al interior de la célula. Las vías activadas por los receptores de GnRH son la vía del inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y la vía de cAMP.

### 1.2.3 Mecanismo de acción de GnRH en ovario

La interacción de la GnRH con su receptor desencadena una cascada de reacciones intracelulares que se inicia con la activación de la proteína G, y conduce a la producción de cAMP, como segundo mensajero (Figura 2), también se han sugerido el mecanismos de acción que implican a los lípidos de membrana  $IP_3$ , así como los canales de  $Ca^{2+}$ . Las gonadotropinas actúan sobre receptores presentes en las células de la teca, y estimula en ellas la producción de testosterona. Esta acción parece implicar la activación del adenilato ciclasa



y la vía del cAMP, como segundo mensajero. Las células de la teca carecen de esta actividad aromatasa por lo tanto no pueden transformar la testosterona en E<sub>2</sub>, sin embargo, esta actividad si esta presente en células de la granulosa, que son capaces de producir E<sub>2</sub> a partir de testosterona suministrada por células de la teca. El E<sub>2</sub> producido por las células de la granulosa es transportado por la circulación al hígado, donde estimula la síntesis y secreción de vitelogenina. Esta vitelogenina es transportada al ovocito e incorporada por micropinocitosis, y es responsable del enorme crecimiento del ovocito durante la fase vitelogénica.

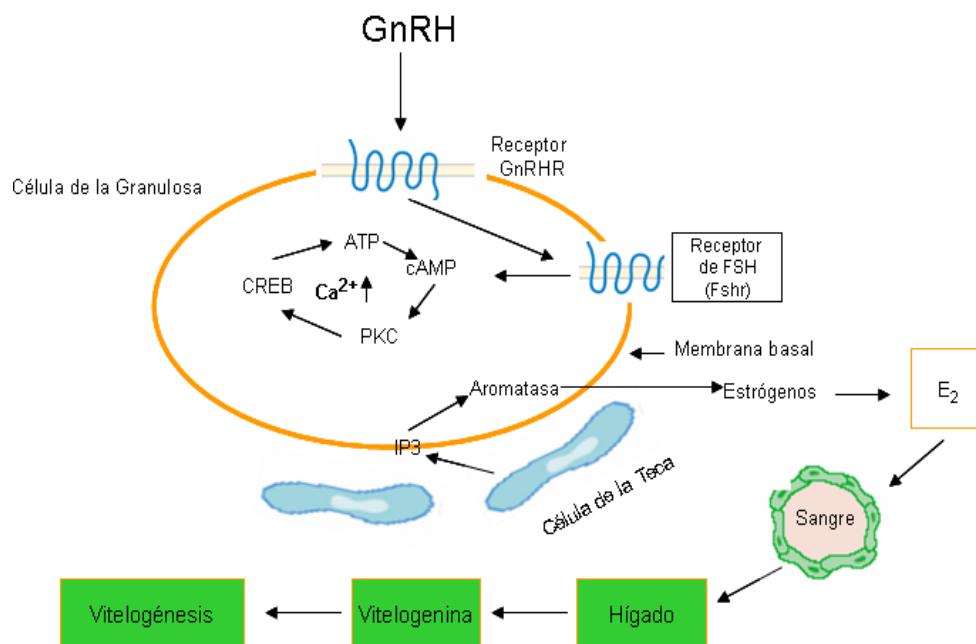


Fig. 2.- Posible papel local de GnRH en tejido reproductivo. GnRH afecta la proliferación de células. En el folículo, FSH dependiente, las células de la granulosa se unen a GnRH. Este péptido puede modular, las concentraciones de AMPc en diferenciación de células de la granulosa.

Se ha visto que en pez dorado, GnRH esta involucrada en la apoptosis o muerte celular programada, está caracterizada por cambios bioquímicos y morfológicos, incluyendo la condensación de la cromatina, la fragmentación de ADN y la formación de cuerpos apoptóticos (Hacker, 2000), La apoptosis involucra la activación secuencial de la cascada de caspasas, a través de las enzimas, cisteina y la asparlatina, que están presentes en las células zimogenas. (Enarie *et al.*, 1998). En particular, la caspasa 3, se ha visto que es responsable de activar al ADN. La inducción de la apoptosis puede ser mediada por una vía de receptores independientes, donde participan factores mitocondriales. Fas, es uno de estos receptores, el cual se ha visto que participa en la inducción de la apoptosis en ovario. La activación de Fas por este ligando (Fas ligando (fas L)), induce la activación de la cascada de caspasa y por ultimo la fragmentación de ADN y la muerte celular (Figura 3).

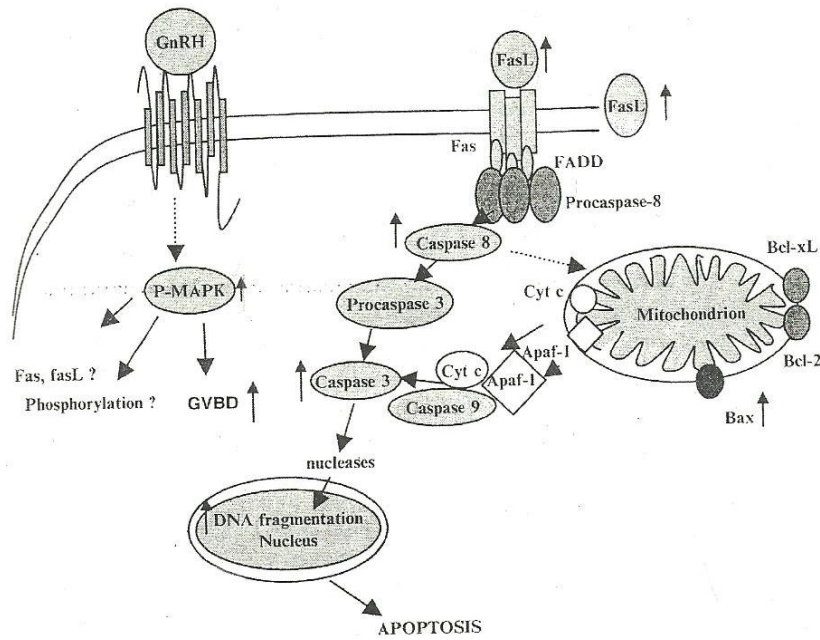


Fig.-3 Mecanismo propuesto, de la participación de GnRH en la apoptosis en tejido ovárico, de pez dorado. En ovarios ovulatory, GnRH interactúa con su receptor, activando la vía de MAPK, la cual incrementa a Fas y fas ligando (fas L), la proteína se fosforila, detiene la meiosis, provocando el rompimiento de la vesícula germinal (GVBD). Un incremento de la Fas/fas L y la interacción de la caspasa 8, la cual está asociada con Fas y pro-caspasa-3, que, a su vez puede activar una nucleasa responsable de la fragmentación de ADN. La activación de la caspasa-8, posiblemente pueda realizar cambios en la membrana mitocondrial, causando la liberación de factores mitocondriales, como el citocromo c (cyt c) y al factor activador apoptótico 1 (Apaf-1). Estos factores son requeridos para la activación de la caspasa 9, posteriormente, esta activa a la caspasa -3, ampliando la señal apoptótica. En relación con los niveles de la familia de proteínas Bcl 2, quizás contribuyen a la liberación de factores mitocondriales. En este caso, el incremento de la proteína Bax equivalente al balance con proteínas anti-apoptóticas Bcl2 y Bcl-xL, incrementando la liberación de cyt c y apaf-1.

#### 1.2.4 Mecanismo de acción de GnRH en testículo

En testículo, GnRH se expresa en células germinales e intersticiales. GnRH incrementa los niveles de AMPc extracelular e intracelular, en diferentes tipos celulares testiculares específicos, con potencias desiguales. GnRH también

participa durante la espermatogénesis testicular (Figura 4). Los receptores GnRHR han sido descritos en células de Leydig, donde activa al ácido araquidónico (AA), probablemente vía fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), y los metabolitos de este ácido parecen estar implicados en la esteroidogénesis inducida por la LH. y la transducción de señales acopladas a canales de Ca<sup>2+</sup> a través de una proteína G.

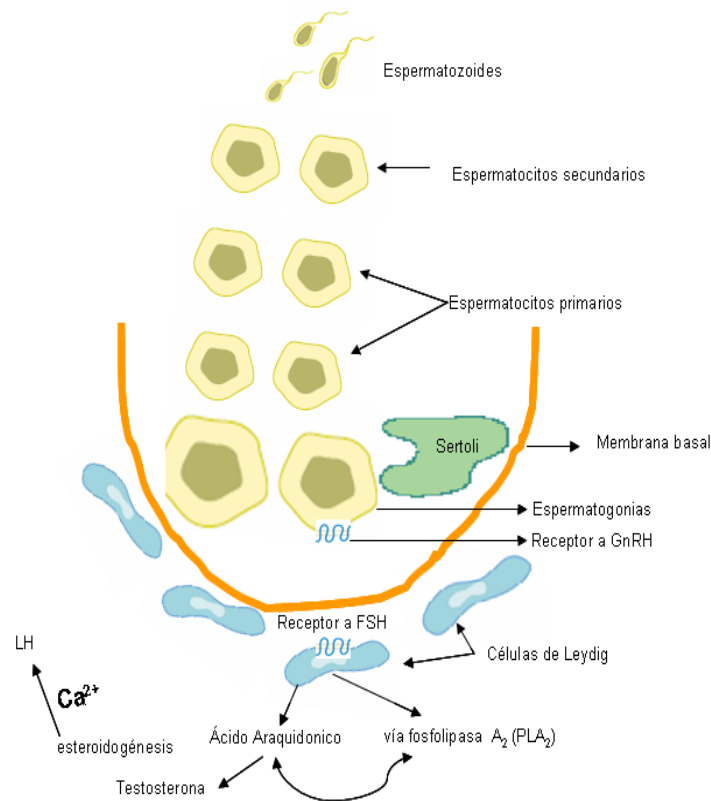


Fig. 4.- Posible papel local de GnRH como un regulador autocrino y parácrino de la actividad gonadal masculina. FSH y LH regulan la actividad sobretudo de los túbulos seminíferos y células de Leydig respectivamente. GnRH intratesticular se ata al receptor GnRHR y activa los sistemas de segundos mensajeros que afectan la esteroidogénesis.

### 1.3 Posición taxonómica y filogenia de *Chirostoma humboldtianum*

La familia Atherinopsidae (Figura. 5) en la cual esta incluido el género *Chirostoma*, cuenta con numerosas especies, unas, habitantes costeras de todos los mares tropicales y templados, otras, limitadas a las aguas dulces.

La familia se considera primariamente marina, se agrupa a los Atherinidos como peces vicarios de agua dulce, por ser de estirpe marina pero que actualmente han conquistado las aguas dulces (Castro, 1978). La invasión más grande de esta familia en aguas dulces se dio en aquellas áreas que tenían poca abundancia de peces dulceacuícolas, como sucedió en Australia, Madagascar, Islas Indopacíficas, México y América Central (Barbour, 1966)

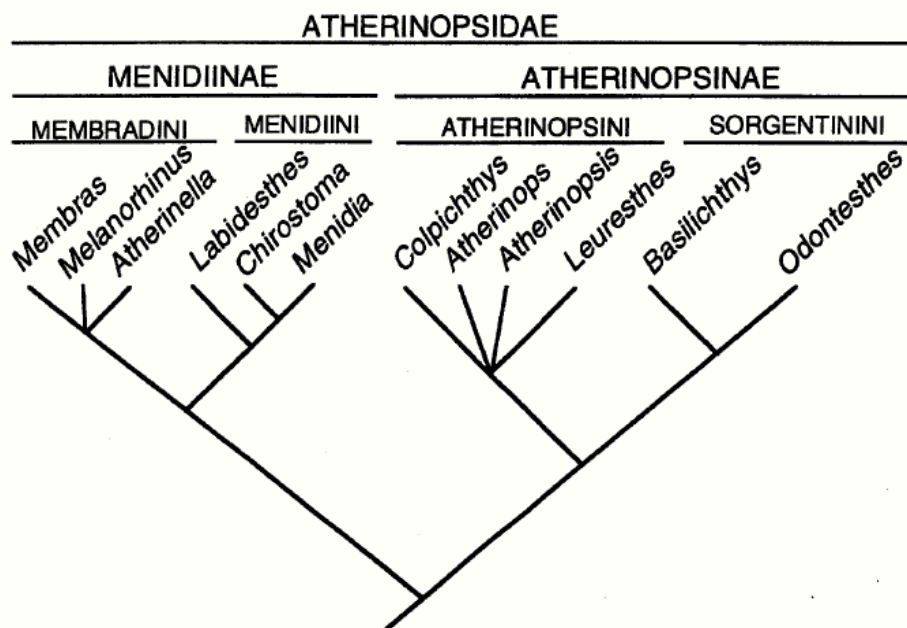


Fig. 5. Relaciones filogenéticas entre géneros de la familia Atherinopsidae ( Dyer y Chernoff, 1996).

En México, el género representativo de la familia Atherinopsidae es *Chirostoma*, que incluye a los charales y pescados blancos (Aguilar y Navarrete, 1996-1997), entre los que destaca *Chirostoma humboldtianum* (Figura.6 ), especie endémica del Altiplano Mexicano, que en la actualidad se encuentra amenazada por la reducción de sus poblaciones y la degradación de su hábitat naturales (Figuroa-Lucero *et al.*,2004).



Fig. 6. *Chirostoma humboldtianum*

#### **1.4 Descripción anatómica e histológica del testículo de *Chirostoma humboldtianum***

Uria *et al.*, 1998, describieron la anatomía, e histología del testículo de *Chirostoma humboldtianum* en diversas etapas del desarrollo gonadal y establecieron la escala de madurez correspondiente.

Los testículos de esta especie, como en otros teleósteos, son órganos pares, de aspecto lanceolado, color blanco ligeramente cremoso, están cubiertos por una túnica albugínea; se encuentran localizados en la región dorsal de la cavidad abdominal, conforme se desarrollan, cubren al tubo digestivo y llegan a ocupar la mayor parte de la cavidad abdominal.

En *C. humboldtianum* la túnica albugínea está formada por tejido conjuntivo denso e irregular, fibras de colágena, fibroblastos y células pigmentarias, aunque en menor proporción que en los mamíferos. El testículo tiene lóbulos, éstos últimos, presentan numerosos túbulos ciegos dispuestos radialmente en relación con los conductos de salida o eferentes, éstos se unen posteriormente al conducto principal, en conjunto forman el elemento tubular. La longitud de los túbulos depende del estadio de madurez gonádica.

Los túbulos en *C. humboldtianum* están formados por diferentes quiste, cuyo desarrollo es asincrónico; dentro de cada cisto el desarrollo de las células gametogénicas es sincrónico. Los cistos están delimitados por las células de Sertoli, las cuales se encuentran rodeando a las células del linaje gamético,

formando los quistes espermáticos, son más evidentes en la región de la corteza del órgano y en los cuales se incluyen espermatogonias, espermatocitos primarios y espermatocitos secundarios. Las células de Sertoli exhiben una forma aplanada.

Las células de Leydig tienen una forma poliédrica y se encuentran fundamentalmente en la parte central del órgano. Estas células presentan abundantes vacuolas citoplasmáticas, las cuales podrían ser precursoras de las hormonas esteroides; tiene un citoplasma acidófilo, núcleo de posición central con su cromatina difusa. (Cárdenas y Barrera, 1998)

#### **1.4.1 Características morfológicas de las células del quiste testicular**

**Espermatogonias.** En promedio miden 7  $\mu\text{m}$  se localizan en cistos próximos a lo que Cormack (1988) llama lámina lúcida de la membrana basal, en la parte distal de los túbulos, esto confirma que este testículo es de tipo espermatogonial restringido. Las espermatogonias son las células más grandes, tiene citoplasma escaso y acidófilo, presenta un núcleo grande localizado en posición central, con la cromatina poco condensada y nucléolo prominente. En esta especie las espermatogonias se presentan en todos los estadios de madurez gonádica.

**Espermatocitos Primarios.** Son células de 3.5  $\mu\text{m}$  en promedio, el núcleo presenta la cromatina de aspecto reticular, el citoplasma es basófilo. Se localizan en quistes a continuación de los que presentan espermatogonias y



hasta el tercio medio del túbulo. Los testículos con menor desarrollo gonádico presentan mayor cantidad de espermatocitos primarios. A medida que el desarrollo celular continua se forman los espermatocitos secundarios.

**Espermatocitos Secundarios.** Son células que miden en promedio 2.8  $\mu\text{m}$ , el núcleo es de forma poliédrica; su cromatina esta muy condensada y el citoplasma es acidófilo.

**Espermátides.** Se encuentran en cistos localizados hacia el tercio proximal de los túbulos, son células que miden en promedio 2.1  $\mu\text{m}$ , el núcleo redondeado y pequeño está desplazado hacia un extremo de la célula, el cotiplasma es acidófilo y escaso.

**Espermatozoides.** Dentro del cisto los espermatozoides forman grupos compactos, en algunos casos se les observa con la cabeza dirigida hacia la parte ciega del túbulo, en otros, las cabezas se orientan hacia el conducto eferente, como si realizara un giro de 180°. El núcleo del espermatozoide es excéntrico, la cabeza mide en promedio 1.4  $\mu\text{m}$ , el flagelo es acidófilo.

#### **1.4.2 Escala histológica de madurez gonádica del testículo de *Chirostoma humboldtianum*.**

**Estadio I**, proliferación espermatogonial o juvenil. El testículo rodeado por la túnica albugínea está constituido por los túbulos que presentan un solo tipo celular, las espermatogonias son grandes con el núcleo y nucléolo conspicuo.

Grier *et, al* (1981) describen que en este estadio las células de Sertoli empiezan a rodear a las espermatogonias. Los conductos eferentes presentan epitelio cúbico simple y el calibre de éstos es mínimo y sin espermatozoides.

**Estadio II, Espermatogénesis temprana.** Los lóbulos están ocupados en la mayor parte por los túbulos, hacia el extremo distal de éstos los cistos presentan espermatogonias, en la parte media se observa a los espermatoцитos primarios y secundarios, los cuales predominan en esta etapa; en la parte proximal se encuentran escasas espermátides y espermatozoides.

**Estadio III, espermatogénesis Tardía.** Dos tercios de los lóbulos están ocupados por los túbulos, éstos en la parte distal presentan cistos con espermatogonias, en el tercio medio tienen espermatoцитos y en el proximal espermátides y espermatozoides. El calibre de los conductos eferentes es mayor y ocupa un tercio del lóbulo; se incrementa el número de espermatozoides en los conductos.

**Estadio IV, Madurez Funcional o Espermatogénesis.** Los túbulos están más reducidos que en el estadio anterior, en la parte distal presentan algunos cistos con espermatogonias, continuación algunos cistos contiene espermatoцитos y espermátides, pero la mayoría se observa con espermatozoides. El diámetro de los conductos eferentes aumenta considerablemente y presenta abundantes espermatozoides.

**Estadio V, Expulsión.** Los túbulos ocupan menos de un tercio del lóbulo, los cistos escasos, contienen espermatogonias, espermatocitos, espermátides y espermatozoides. Los conductos eferentes se encuentran llenos de espermatozoides.

#### **1.4.3 Descripción anatómica e histológica del ovario de *Chirostoma humboldtianum***

Cárdenas *et al.*, 2008, realizaron un estudio de la estructura y ultraestructura del ovario de *C. humboldtianum*, establecieron que el ovario es un órgano par y elongado, el cual está localizado a lo largo de la pared abdominal. En la parte posterior, el ovario contiene un conducto corto. Los ovarios inmaduros son de color blanco, con pequeños puntos oscuros, conforme maduran, aparecen más melanóforos, los cuales recubren toda la superficie; y como consecuencia, la gónada cambia a un color negro. Esta pigmentación, permanece por el resto de la vida de la hembra. La pared del ovario tiene músculo liso. Las hembras jóvenes, tiene pocas células, mismas que proliferan causando el engrosamiento de la capa. Los ovarios son asincrónicos durante su desarrollo, internamente se distinguen lamelas, especialmente, durante el crecimiento primario en peces jóvenes. El proceso completo de la ovogénesis, esta dividido en V estadios: ovogénesis temprana (formación de un nuevo ovocito y folículos), crecimiento del ovocito cortical primario, estadio lípido, vitelogénesis y maduración.

**Ovocito temprano**, (miden de 10 a 25  $\mu\text{m}$ ). En el ovario de adultos, las ovogonias son poco visibles porque están encerradas por células epiteliales. Los ovocitos en meiosis, poseen pequeños grupos de células foliculares, un núcleo esférico con un solo nucléolo y poco citoplasma con ribosomas, mitocondrias y retículo endoplásmico. Las células foliculares comienzan a rodear al ovocito durante el inicio de la meiosis.

**Crecimiento primario del ovocito**, (miden de 25 a 270  $\mu\text{m}$ ). La primera fase del crecimiento del ovocito, comienza con el retraso de la meiosis. En este momento, el núcleo es esférico y se encuentra en posición central. Inicialmente, los nucleólos se encuentran dispersos por todo el núcleoplasma, pero pronto toman una ubicación más periférica cerca de la cubierta nuclear. Existe un importante flujo de material del núcleo al citoplasma. El ovocito muestra una alta basofilia en el citoplasma y presenta pocas estructuras, entre ellas se puede citar al retículo endoplásmico que es fácilmente distinguible. La basofilia es por la gran cantidad de ribosomas libres que dan una apariencia granular al citoplasma. También, los grupos de mitocondrias están presentes; estos organelos son redondeados con numerosas crestas. El desarrollo del ovocito continúa y su tamaño va aumentando, disminuye la basofilia y hay más organelos membranosos como el retículo endoplásmico rugoso (RER) y el aparato de Golgi. En este momento las mitocondrias están distribuidas por todo el citoplasma incluyendo la región periférica del ovocito. En la fase final de este estadio, el corion (envoltura vitelina y/o zona radiada), comienza a formar una de sus capas (ZI). Algunas microvellosidades del ovocito pueden ser encontradas alcanzando el espacio extracelular cercano a

las células foliculares (granulosa) que rodean al ovocito. En el sistema del folículo joven, las células de la granulosa tienen pocas mitocondrias y retículo endoplásmico. Al final de esta fase, se presentan cambios morfológicos haciendo que estas células sean menos planas. En la parte exterior del corion, los filamentos comienzan a distinguirse. Durante el resto de la ovogénesis, los filamentos continúan su desarrollo, incrementando su diámetro y envolviendo el ovocito. Su función es unir el embrión con el sustrato.

**Crecimiento secundario del ovocito**, (mide de 270 a 380  $\mu\text{m}$ ). Este estadio comienza cuando se forman alveolos corticales y vesículas lipídicas. Las vacuolas lipídicas, son homogéneas, moderadamente electrodensas y tiene una superficie interna lisa. La acumulación de lípidos continúa durante la vitelogénesis. Los alvéolos corticales se localizan en la periferia del ovocito. El citoplasma contiene ribosomas libres, retículo endoplásmico rugoso y mitocondrias. En el interior del núcleo la cromatina se aprecia un tanto descondensada y los nucleólos continúan cercanos a la envoltura nuclear. Las microvellosidades del ovocito, se extienden por todo el corion, alrededor de las células de la granulosa. Durante este estadio las células de la granulosa cambian completamente su morfología, forman filamentos que alcanzan la periferia del ovocito. Las células foliculares desarrollan vacuolas en el interior del citoplasma.

**Vitelogénesis**, (mide de 380 a 650  $\mu\text{m}$  ). Este estadio está caracterizado por un incremento sustancial en el tamaño del ovocito, causado por la incorporación de vitelo al citoplasma que se distingue en forma de plaquetas

vitelinas. El corion comienza a engrosarse por adición de capas protéicas (Z2 y Z3), la capa interna tiene una apariencia geométrica ordenada. Las microvellosidades pasan por los poros del corion llegando al frente de las células de la granulosa. Estas células incrementan su talla y tienen agrupaciones de mitocondrias y abundante retículo endoplásmico rugoso.

**Maduración**, (miden de 650 a 1150  $\mu\text{m}$ ). El crecimiento del ovocito continúa y el principal evento de este estadio es la reanudación de la meiosis. Comienza con la migración del núcleo al polo animal del ovocito. Después la vesícula germinal se rompe. Las proteínas del vitelo sufren una desorganización, probablemente por la hidrólisis de sus componentes, resultando una masa irregular, que ocupa un área mayor en el centro del ovocito. Los lípidos acumulados durante la vitelogénesis se asocian y forman varias gotas distinguibles en el hemisferio animal. Todos estos eventos son seguidos por la hidratación del ovocito.

## **2 Justificación**

La producción del charal ha venido disminuyendo en los años recientes (Navarrete y Cházaro 1992), de tal manera que resulta de gran relevancia el conocimiento de la alimentación, reproducción y crecimiento del género, en particular de la especie *Chirostoma humboldtianum* que es el charal con un importante valor comercial, además de ser una especie endémica del Altiplano mexicano que en la actualidad se encuentra amenazada por la reducción de sus poblaciones y la degradación de su hábitat natural. Por ello, en el presente estudio se propone conocer la distribución de sGnRH en gónadas de *C.humboldtianum*, con lo cual se pretende sentar las bases para posteriores estudios de la biología reproductiva de la especie, contribuyendo a establecer principios más consistentes para la realización de cultivos comerciales de este grupo de peces de gran importancia económica en México.

### **3. Objetivos**

#### **Objetivo General:**

Establecer la distribución de la Isoforma de salmón de GnRH (sGnRH) en las gónadas de *Chirostoma humboldtianum*

#### **Objetivos Particulares:**

Determinar la distribución de la Isoforma de salmón de GnRH (sGnRH), en le testículo de *Chirostoma humboldtianum*

Determinar la distribución de la Isoforma de salmón de GnRH (sGnRH), en el ovario de *Chirostoma humboldtianum*



## **4. Materiales y Métodos**

### **Fase de campo**

#### **4.1 Obtención del tejido**

Los charales (*Chirostoma humboldtianum*), se colectaron en la laguna de Zacapu, Michoacán, en los meses de enero- abril y septiembre- noviembre, que fundamentalmente corresponden a las etapas de recrudescencia y madurez. La razón de haber obtenido el material biológico en estos meses fue que se presentó una veda de mayo a agosto. Una vez obtenido los organismos se anestesiaron con MS 222 y fueron sacrificados por medio de un corte transversal, en la porción ventral. Se extrajeron las gónadas, las cuales se fijaron en paraformaldehído al 2% y ácido pícrico, en amortiguador de fosfatos (Sterfanini *et al*, 1976).

### **Fase de laboratorio**

#### **4.2 Procesamiento del tejido.**

Los tejidos obtenidos fueron deshidratados en alcoholes a concentraciones crecientes (70% a 100 %). Se continuó con un aclarado e infiltración en parafina para ser incluidos en paraplast. Se realizaron cortes histológicos, en un micrótopo rotatorio. Los ovarios se cortaron a 7 $\mu$ , mientras que los testículos a 4 $\mu$ . Los cortes, se desparafinaron con Xilol I y II, por cinco minutos en cada uno. Posteriormente se hidrataron con un tren de alcoholes de manera decreciente (100% a 70%) en un intervalo de un minuto. Finalmente, se realizó la técnica de inmunohistoquímica. Que a continuación se describe.

### **4.3 Inmunohistoquímica.**

Una vez hidratado el tejido éste se permeabilizó con metanol a - 20°C, durante 5 minutos. Posteriormente, se lavó con PBS (0.1 M, pH 7.4) y se procedió a inactivar la peroxidasa endógena con etanol ácido. Los cortes se lavaron tres veces con el mismo amortiguador e inmediatamente después, se bloquearon los sitios inespecíficos con suero bovino al 1% con PBS (0.1 M, pH 7.4) a temperatura ambiente, durante media hora. Una vez bloqueados los sitios inespecíficos se incubó con un anticuerpo de anti sGnRH en una dilución 1:5000 $\mu$  a 4° C durante toda la noche. Cumplido el tiempo se lavó con PBS (0.1 M, pH 7.4) y se procedió a incubar con un anticuerpo de chivo anti-IgG de conejo en una dilución 5:1000 $\mu$ , por 2 horas a temperatura ambiente. Al término de la incubación, se lavó con PBS (0.1 M, pH 7.4) y se procedió a revelar, utilizando una solución sustrato con 20 mg de diaminobecidina (DAB), (500 $\mu$  de peróxido de hidrógeno al 30% + 967 ml de agua, pH 7.4). Se observó la reacción en un intervalo de 1 a 20 min. Se procedió a lavar nuevamente con PBS (1:3 M, pH 7.4). Después, se contratiñó con hematoxilina de Mayer y se deshidrató mediante concentraciones crecientes de alcohol (70%, 80%, 90%, 96% y 100%), y Xilol I y II, posteriormente se realizó el montaje con resina sintética de Entellan y las laminillas se observaron en un microscopio Nikon.

#### **4.4 Controles**

Se realizaron tres controles, para corroborar que la inmunoreacción fuera específica para sGnRH, 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 (sGnRH) y con el segundo anticuerpo (anti IgG de chivo anticonejo), diluidos en PBS, en el cual también se observó 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, las muestras se observaron a microscopio.

## 5. Resultados

En este estudio, se investigó la presencia de la isoforma de sGnRH, en gónadas de *Chirostoma humboldtianum*. Las muestras corresponden a los meses de septiembre- noviembre y enero- abril, que fundamentalmente corresponden a las etapas de recrudescencia y madurez. La reacción inmunopositiva fue localizada en etapas tempranas e intermedias de la ovogénesis, desde ovogonias, ovocitos primarios previtelogénicos hasta etapa de vitelogénesis avanzada. En fases posteriores del desarrollo de los ovocitos, no se detectó inmunoreacción. En testículo, la presencia de sGnRH se encontró durante las fases iniciales de la gametogénesis. Especialmente, en espermatogonias y fundamentalmente, en espermatocitos primarios (Figura. 7), no encontrando presencia de la hormona en espermatocitos secundarios, espermátides ni espermatozoides. Tampoco fue evidente que las células de Leydig y de Sertoli contuvieran sGnRH. Los resultados obtenidos en testículo son similares a otras especies en las que GnRH se ha asociado con la estimulación de la proliferación y diferenciación en la espermatogénesis.

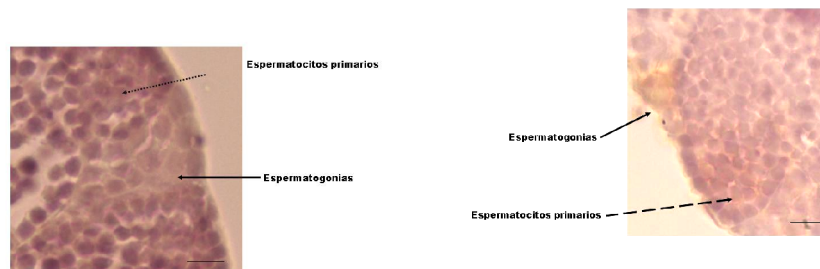


Fig. 7. Corte transversal de testículo de *Chirostoma humboldtianum*, se observa inmunoreacción, en espermatogonias y espermatocitos primarios 100X.

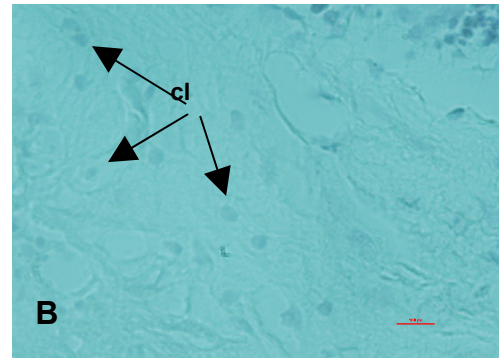
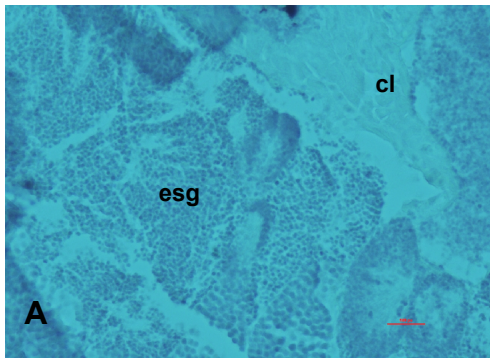


Fig. 8. Corte transversal de testículo de *Chirostoma humboldtianum* . A. Se muestra espermatogonias (esg) y células de Leyding (cl) 40X, no presentaron reacción a sGnRH. B. Se observa un aumento a 100X, de la figura 8 (A), donde se observan células de Leyding (cl), las cuales no presentan reacción a sGnRH.

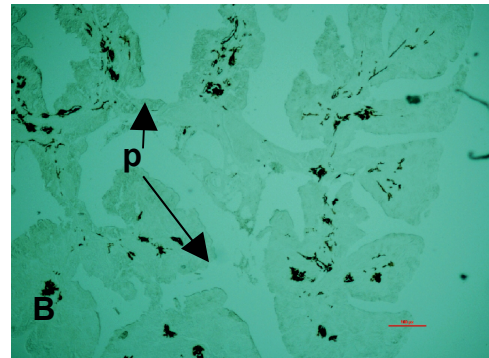
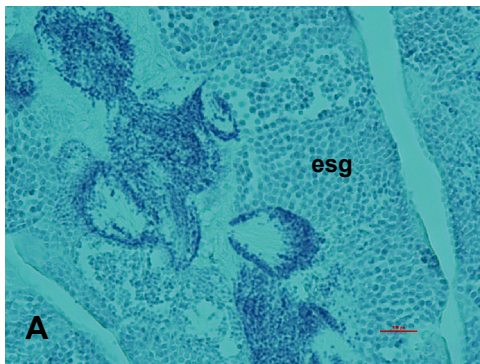


Fig. 9.- Corte transversal de testículo de *Chirostoma humboldtianum*. A. no se observa reacción en espermatogonias (esg) 40X. B. muestra un aumento de 4X, donde se puede observar pigmento (p), no existe reacción a sGnRH.

En ovario parece participar en el desarrollo temprano y durante la vitelogenesis, ya que la reacción inmunopositiva fue localizada en etapas tempranas e intermedias de la ovogénesis, especialmente en células de la granulosa y en células de la teca de ovocitos vitelogénicos tempranos así como en ovocitos previtelogénicos (Figura 9 A y B).

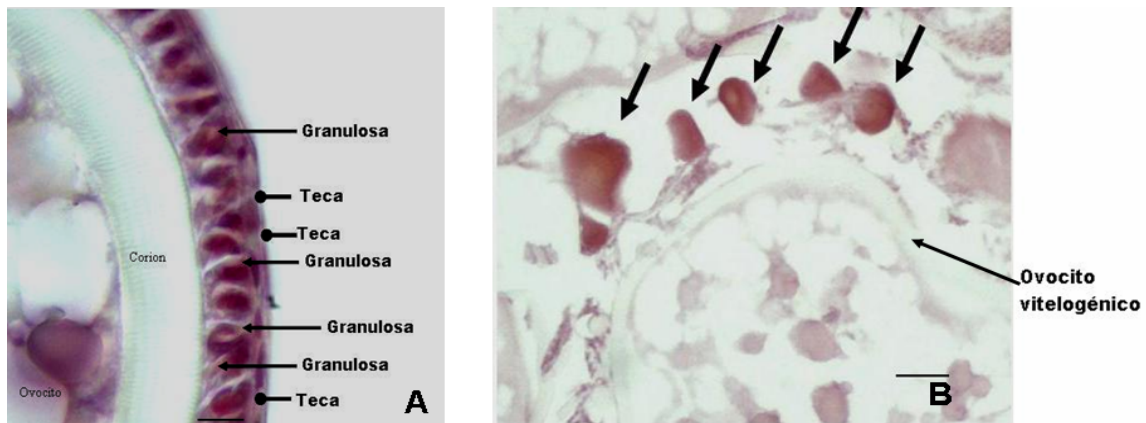


Fig. 10. Corte transversal de ovario de *Chirostoma humboldtianum*, se observa inmunoreacción (A) en células de la granulosa y en células de la teca 100X. La inmunoreacción también se observó en ovocitos previtelogénicos (flechas, Fig.B) 40X.

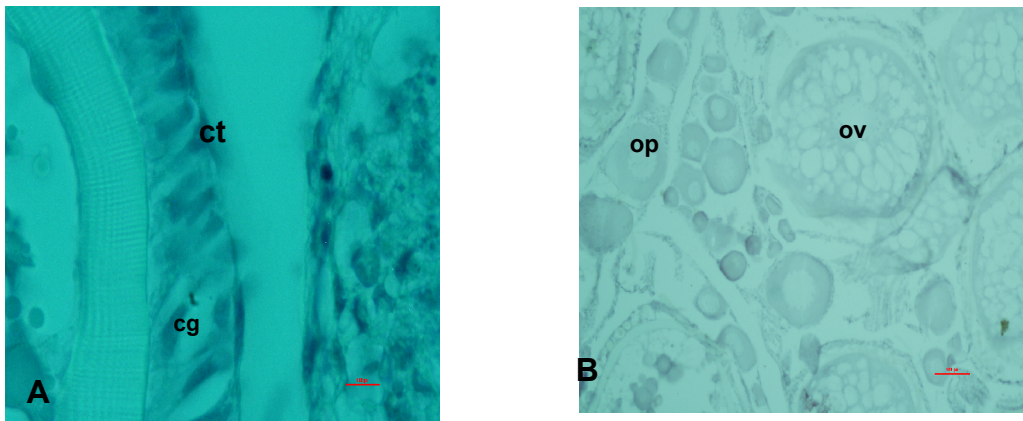


Fig.11. Se observa, corte transversal de ovario de *Chirostoma humboldtianum*, A reacción negativa a sGnRH en células de la teca (ct) y granulosa (cg) 100X. Fig. B, no mostró reacción en ovocito previtelogénico (op) y en ovocito vitelogenico (ov) 10X.

Las muestras controles (Figura 12 y 13), presentaron inmunoreacción negativa, esto indica que las reacciones observadas en los cortes en los que se realizó la técnica inmunohistoquímica, en efecto expresan a sGnRH.

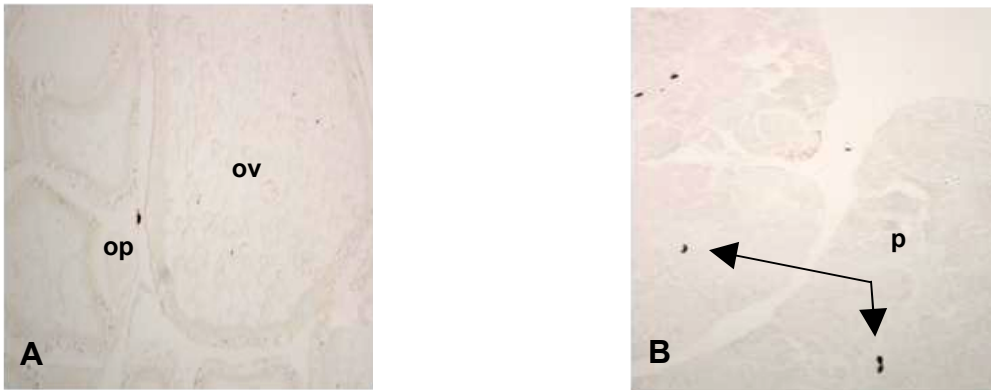


Fig. 12 Controles realizados 40X para ovario (A) y testículo (B) de *Chirostoma humboldtianum*. Ovario vitelogenico (ov), ovario previtelogenico (op), pigmento (p).

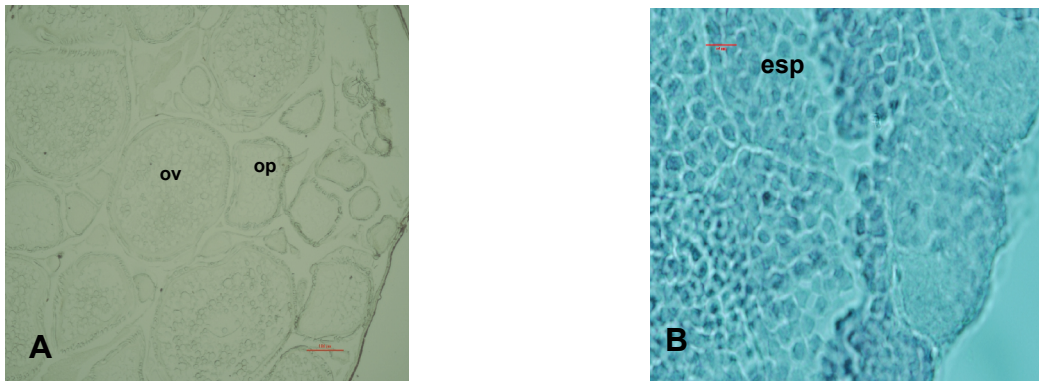


Fig. 13. Controles realizados de ovario (A) 4X y testículo (B) 100X de *Chirostoma humboldtianum*. Ovario vitelogenico (ov), ovario previtelogenico (op), Espermatogonias (esp).

		RECRUDESCENCIA			MADUREZ			
		SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
<b>PREVITELOGENESIS</b>	Ovocito	-	-	-	-	-	-	-
	Células de la granulosa	+	+	+	+++	++	+++	+
	Células de la teca	+	+	+	++	++	+	+
<b>VITELOGÉNESIS TEMPRANA</b>	Ovocito	-	-	-	-	-	-	-
	Células de la granulosa	+	+	+	+++	+	+	+
	Células de la teca	++	++	+	++	+	+	+
<b>VITELOGÉNESIS EXOGENA TEMPRANA</b>	Ovocito	-	-	-	-	-	-	-
	Células de la granulosa	+++	++	+	+++	+++	+	+
	Células de la teca	+++	++	+	+++	+++	+	+

Tabla 1.- Se presentan los meses en los que se realizaron las colectas de los ovarios de *Chirostoma humboldtianum*, los estadios y las células en las que se observó una reacción positiva a sGnRH. +++ Reacción abundante, ++ reacción moderada, + poca reacción.



	RECRUDESCENCIA			MADUREZ			
Células del cisto testicular	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL
Espermatogonias	++	+	+++	+++	++	+	+
Espermatocitos primarios	++	+	+++	+++	+	+	+
Espermatocitos secundarios	-	-	-	-	-	-	-
Espermátides	-	-	-	-	-	-	-
Espermatozoides	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 2.- se presentan los meses en los que se realizaron las colectas de los testículos de *Chirostoma Humboldtianum* y las células en las que se observó una reacción positiva a sGnRH. +++ Reacción abundante, ++ reacción moderada, + poca reacción

## 6. Discusión

En el presente trabajo se describe por primera vez la presencia de la isoforma de sGnRH en las gónadas de *Chirostoma humboldtianum*. En otras especies de teleósteos la presencia de GnRH en la gónada ha sido asociada con diversos procesos. En ovarios de salmónidos, específicamente, de trucha arcoiris, Uzbekoba *et al.*, (2001; 2002) han reportado la presencia del mRNA de sGnRH en folículos previtelogénicos y durante la vitelogénesis temprana, mientras que otro reporte para la misma especie (Gray *et al.*, 2002) refiere una expresión intermitente de la GnRH en el ovario durante la etapa adulta del pez, pero el péptido no se pudo detectar ni por radioinmunoanálisis y por cromatografía líquida de alta resolución, por lo que no es claro, si el mRNA no es traducido, o bien el péptido formado es rápidamente utilizado y degradado, o alguna otra posibilidad. Estos resultados sugieren que la GnRH juega un papel en previtelogénesis, vitelogénesis temprana, mientras que durante la fase adulta aunque parece participar en la ovogénesis de la trucha, posiblemente en la reactivación de la meiosis como en otras especies, es difícil de concluir por las metodologías usadas por Gray *et al.*, (2002). En el ovario de *Sparus aurata* y *Carassius auratus*, se ha reportado que la presencia de GnRH ayuda a la reiniciación de la meiosis, por lo que, se ha sugerido que al menos para estas especies, participa en la maduración final del ovocito (Nabissi *et al.*, 2000; Habibi *et al.*, 1998). Evidentemente, para ejercer sus efectos es necesaria la presencia de receptores a GnRH (GnRHR) en las gónadas. Usando como modelo de estudio al pez dorado, *Carassius auratus*, el mecanismo que parecen utilizar los GnRHR es a través de la activación de la proteinquinasa C

(PKC) y la producción del ácido araquidónico, ello para la estimulación de la esteroidogénesis y la reactivación de la meiosis (Pati y Habibi 2002). A la fecha no es posible descartar que en las gónadas pueda haber también la producción de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) como sucede en la hipófisis de algunas especies de teleósteos (Levavi-Sivan y Avitan 2005). En especies taxonómicamente cercanas a *Ch. humboldtianum* como *O. bonairenses*, trabajos en los que han detectado en el ovario la expresión de las diferentes isoformas de GnRH presente en la especie (sGnRH, pjGnRH y cGnRH-II) concluyen que las isoformas sGnRH y pjGnRH son las más importantes por su expresión en dicho órgano, en particular los niveles de expresión aumentan durante las etapas de recrudescencia y madurez (Guilgur *et al.*, 2009). Desafortunadamente, en este estudio no se trabajó testículo, por lo cual no existe referente para comparar con dicha especie.

En *Ch. humboldtianum*, debido a las etapas en las cuales se detectó sGnRH la hormona parece participar en los eventos tempranos de la ovogénesis, debido a que se encontró el péptido durante las fases tempranas del desarrollo en ovocitos previtelogénicos y vitelogénesis temprana. Como se mencionó anteriormente, esto es similar a lo reportado para especies de salmónidos y el pez dorado, así como la dorada.

Existen varias posibilidades para el hecho de no haber detectado el péptido en las últimas fases de la ovogénesis, ello puede ser debido, efectivamente, a la ausencia de la hormona, como fue reportado para el ovario de trucha arcoiris por Gray *et al.*, (2002). Otra posibilidad es que, aunque presente la hormona, la concentración que tenga no permita su detección por medio de la técnica

inmunohistoquímica. Existe otra tercera posibilidad, que la sGnRH se expresen de una manera intermitente y las fechas de colecta no coincidieran con los momentos de expresión y traducción de la hormona, debido quizá a que los ovarios no contuvieran ovocito en la etapa de maduración final, es decir, de 48-72 horas previas a la ovulación que es cuando ocurre el reinicio de la meiosis.

Recientemente, se ha reportado que la expresión de la isoforma sGnRH en concentraciones bajas y medias puede jugar papeles protectores, pero a concentraciones elevadas puede desempeñar un papel proapoptótico en el ovario de los teleósteos guiando a la degeneración del ovocito (Habibi y Andreu-Vieyra, 2000). En el caso de la especie trabajada en el presente estudio, no se detectaron folículos atrésicos, por lo cual, no fue posible establecer la presencia de GnRH en este proceso. Una explicación posible al hecho de no haber encontrado cuerpos atrésicos en el ovario, es que su presencia está más vinculada con un desarrollo fallido de la ovogénesis, y dado que los ovarios no se encontraban en etapa de regresión temprana, de existir ovocitos con condiciones deficientes de desarrollo, es poco probable que se pusieran de manifiesto, con cambios marcados en el núcleo y activación de caspasas.

El testículo es menos estudiado en estos aspectos que el ovario. En *Carassius auratus*, cultivos de testículo con medio adicionado con GnRH estimulan el inicio de la espermatogénesis, en particular, de la meiosis (Pati y Habibi., 1993). En el presente trabajo la detección de la hormona se presentó fundamentalmente en espermatogonias y espermatocitos primarios, estos

últimos es sabido son los que inician la meiosis. La presencia de la GnRH parece no ser esencial para etapas intermedias de la espermatogénesis y por estudios en otras especies, sabemos que en machos la GnRH participa en la iniciación de la espermatogénesis, desaparece en la etapa II y aumenta progresivamente hasta la etapa VI (Uzbekova et al., 2001). En otro estudio con atún aleta azul, *Thunnus thynnus*, implantes de análogos de GnRH promovieron la mitosis de espermatogonias disminuyeron la apoptosis en dicha gónada, cuando fueron comparados con los organismos control (Corriero et al., 2009) decremento de la expresión del mRNA de la sGnRH durante el periodo activo de la proliferación espermatogonial y durante la meiosis, sugiere que es anti- proliferativo y tiene un efecto simultáneo durante la meiosis. Los resultados son consistentes con dichas observaciones.

De manera similar al ovario y para la misma especie (*Carassius auratus*), se ha reportado que en el testículo, la presencia de GnRH en cultivos puede vincularse con la apoptosis en testículo solo bajo condiciones de madurez y después de 24 horas de cultivo con la hormona presente en el medio (Andrew-Vieyra et al., 2005). A este respecto cabe señalar que en todas las colectas realizadas en el periodo de tiempo de este trabajo, la captura de machos fue muy baja, por lo cual el número de muestras disponible fue menor al deseado. Además, si bien se obtuvo un poco de esperma al realizar la presión abdominal a los machos, los testículos no parecieran estar en una condición alrededor de la liberación de gametos. De tal manera, se recomienda extender el número de muestras y las fechas con objeto de establecer si la GnRH desarrolla algún papel importante en la apoptosis testicular.

Es posible afirmar que se tiene presencia de sGnRH en las gónadas de *Chirostoma humboldtianum*, y dado que el anticuerpo utilizado fue elaborado contra el sGAP, será interesante determinar si al igual que en otras tantas especies de teleósteos como en el pez dorado, *Carassius auratus*, la trucha arcoíris, *O. mykiss*, la dorada, *Sparus aurata*, y el pejerrey argentino *O. bonaiensis*, por citar algunas, se presentan varias isoformas de GnRHs.

## 7. Conclusión

En *Chirostoma humboldtianum* la distribución de la isoforma de salmón (sGnRH), en las gónadas, específicamente en ovocitos previtelogénicos, células foliculares tecaes, así como en espermatogonias y espermatocitos primarios.



## 8. Referencias

- o Adelman JP, Mason AJ, Hayflick JS, Seeburg. 1986. Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotrophin-releasing hormone and prolactin releaseinhibiting factor in human and rat. Proc Natl Acad Sci U S A; 83(1):179-83.
- o Aguilar,P.J.F & Navarrete, S.N.1996. Crecimiento, condición y Mortalidad del charal *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinidae) en México. Rev. Biol.. Trop.44(3).pp
- o Amano, M., Oka, Y., Aida, K., Okumoto, N., Kawashima, S. & Hasegawa, Y. 1991. Immunocytochemical demonstation of salmon GnRH and chicken GnRH-II in the brain of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. J Comp Neurol. 314: 587-597.
- o Amano, M., Ashihara, M., Yoshiura, Y., Kitamura, K., Ikuta, K. & Aida, K. 1998. Two differing salmon GnRH precursor mRNAs are co-expressed in the brain of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*).Cell Tissue Res. 292: 267-273.
- o Amano, M., Takahashi, A., Yamanome, T., Okubo, k. & Yamamori, K. 2002. Molecular cloning of three cDNAs encoding different GnRH in the brain of Barfin flounder. Gen Comp Endocrinol 126: 325-333.

- o Andreu – Vieyra CV. 2003. GnRH and gonadotropin effects on the *Carassius auratus* ovary: Induction of apoptosis and hormonal interactions chapter 6. In: University of Calgary Theses, editor. Gonatropin–releasing hormone (GnRH) control of apoptosis: A comparative study on goldfish gonadal tissues and human hepatocarcinoma cell lines. Calgary, Alberta, Canada: Biological Sciences, University of Calgary; 2003, pp.138 – 176.
  
- o Andreu-Vieyra. C.V & Habibi. H.R. 2000. Factors controlling ovarian apoptosis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 78(12): 1003–1012
  
- o Andreu-Vieyra. C.V, Andre G. & Habibi, H. 2005. Gonadotropin-Releasing Hormone Induction of Apoptosis in the Testes of Goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* 146(3):1588–1596
  
- o Allan, D.J., Harmon, B.V., Kerr, J.F.R., 1987. Cell death in spermatogenesis, In: Potten, C.S.(Ed.), *perspectives on Mammalian Cell Death*. Oxford University Press, London, pp. 229-258.
  
- o Andreu – Vieyra CV, Habibi HR. 2000. Factors controlling ovarian apoptosis. *Can J Physiol Pharmacol* 78: 1003-1012.

- o Andreu – Vieyra CV, Buret AG, Habibi HR. 2005. Gonadotropin–Releasing hormone induction of apoptosis in the testes of goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* 146: 1588-1596.
  
- o Barbour, C.D. 1966. The systematic and evolution of genus *Chirostoma*.ph. D. Tesi Tulane University.U.S.A.pp.
  
- o Barbour, C.D. 1973. The systematic and evolution of genus *Chirostoma* Swainson (Pisces: Atherinidae) *Tulane Stud. Zool. Bot.* 18: 97-141
  
- o Burmeister, S., Jarvis, E. & Fernald, R. 2005. Rapid Behavioral and Genomic Responses to Social Opportunity. *Plos Biology.* 11: 1996-2004.
  
- o Cardenas, R. & H. Barrera.1998. Histología y ultraestructura del testículo del charal *Chirostoma jordani* (Osteictyes: Atherinidae). *Int. J. Trop.Biol. Cons.*46:943-946.
  
- o Cardenas, R. , M. Chávez, J.L. González, P. Aley, J. Espinosa & L.F. Jiménez-García. 2008. Oocyte structure and ultrastructure in the Mexican silver-side fish *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniforme: Atherinopsidae). *Int. J. Trop. Biol. Vol.* 56 (3): 1371-1380.

- o Castro- Aguirre,,J .L. 1978. Catálogo sistemático de los peces marinos que penetran a las aguas continentales de México con aspectos zoogeográficos y ecológicos. Departamento de pesca. México.199, 207-209
- o Carrillo,M., & ,Zayun S., 1993. Fisiología de la reproducción: Fisiología de la reproducción de los Teleósteos. En Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la reproducción. Pp:125-142.Coord.F.Castelló Orsay. Ed. Universitat de Barcelona.
- o Corriero. A, Medinab. A, Mylonas.C. Bridgesd.C, Santamariaa.N, Deflorioa. M. Losurdoa. M, Zupaa.R, Gordine.H, Gandaraf.F, Belmonte Riosg.A, Pousisa.C & Metrio.G, 2009. Proliferation and apoptosis of male germ cells in captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus L.*) treated with gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH). Anim. Reproduction Science.346-357.
- o Dickey,J. & Swanson, P. 2000. Effects of salmon gonadotropin-releasing hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon(*Oncorhynchus kisutch*). Gen. Comp. Endocrinol. 118: 436-449.
- o Dyer, B.S., Chernoff, B.1996. Phylogenetic relationships among atheriniform fishes (Teleostei: Atherinimorpha). Zool.J.Linn.Soc. 117: 1-69.

- o Elson, C.O. Holland, S.P., Dertzbaugh, M.T. ,Cuff, C.F., & Anderson, A.O.L. 1995 Morphologic and functional alterations of mucosal T cells by cholera toxin and Hs B subunit 1. *Journal of immunology*.154: 1032-1040.
- o Enari, M., Sakahira, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. A. (1998). caspase-activated DNase that degrades DNA during, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.
- o Enomoto, M. & Kyun, M. 2004. GnRH as a cell proliferation regulator: Mechanism of action and evolutionary implications. *Zool. Sci.* 21: 1005-1013.
- o Figueroa- Lucero, G., Meza,G., Hernández, R., Barriga, S., Rodríguez, C, & Arredondo, F.J.L. 2004. Growth, survival and mandible development in the larvae of the shortfin silverside *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) (Atheriniformes: Atherinopsidae) under laboratory conditions. *Aquaculture*. (242): 689-696.
- o Fernández Fernández, R., Martín,A., Navarro,V., Castellano,J., Dieguez,C., Aguilar ,E., Pinilla, L. & Tena-Sempere,M. 2006. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol*. 254-255:127-132

- o González-Martínez, D., Zmora, N. & Mañanos, E. 2002. Immunohistochemical localization of three different prepo-GnRHs in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides. *J Comp Neurol.* 446: 95-113.
- o Gothilf Y, Muñoz-Cueto JA, Sagrillo CA, Selmanoff M, Chen TT, Kah O, Elizur A, Zohar Y. 1996. Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. *Biol Reprod*; 55:636-645.
- o Gopinath, A., Tseng, A. & Whitlock, K. 2004. Temporal and spatial expression of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the brain of developing zebrafish (*Danio rerio*). *Gene Expression Patterns.* 4: 65–70.
- o Guilgur. L.G, Strüssmann. C & Somoza. G.M 2009. mRNA expression of GnRH variants and receptors in the brain, pituitary and ovaries of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) in relation to the reproductive status. *Physiol Biochem.* 35:157–166
- o Gur,G., Melamed,P., Gissis,A.& Yaron,Z. 2000.Changes along the pituitary-gonadal axis during maturation of the black carp, *Mylopharyngodon piceus*. *J Exp Zool.* 286(4):405-13.

- o Grier, H.J.1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Am.Zool.*21:345-357.
  
- o Gray, S., Adams, B., Warby, C., von Schalburg, K. & Sherwood, N. 2002. Transcription and Translation of the salmon Gonadotropin-Releasing Hormone Genes in brain and gonads of sexually maturing Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod.* 67: 1621-1627.
  
- o Habibi, H.R., Van der Kraak, G., Bulanski, E., Peter, R.E.,1998. Effects of teleost GnRH on reinitiation of oocyte meiosis in goldfish in vitro. *Am.J. Physiol.*255,R268-R273.
  
- o Hacker, G. 2000.The morphology of apoptosis. *Cell Tiss. Res.* 301:5-17
  
- o Ishizaki, M., Iigo, M., Yamamoto, N. & Oka, K. 2004. Different Modes of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) release from multiple GnRH systems as revealed by radioimmunoassay using brain slices of a teleost, the dwarf gourami (*Colisa lalia*). *Endocrinol.* 145: 2092–2103.
  
- o Kah, O., Anglade, I., Leprêtre, E., Dubourg, P., & de Monbrison, D. 1993. The reproductive brain in fish. *Fish Physiol.Biochem.*,11:85-98.

- o Kuo, M., Lou, S. postlethwait, J. & Chung B.2005. Chromosomal organization, evolutionary relationship and expression of zebrafish GnRH family members. *J Biomed Sci.* 12:629-639.
  
- o Kerr J F, Wyllie AH, Currie AR.1972. Apoptosis: A Basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
  
- o Kaiser, U., Conn, M., & Chin, W. 1997. Studies of GnRH action using GnRH receptor expressing pituitary cell lines. *Endocrinol Rev.* 18: 46-70.
  
- o Kitahashi, T., Alok, D. Ando, H., Kaeriyama, M., Zohar, Y., Ueda, H. & Urano, A. 1998. GnRH analog stimulates gonadotropin gene expression in maturing sockeye salmon. *Zool Sci USA.* 15: 761-765.
  
- o Kobayashi, M., Amano, M., Kim M., Yoshiura Y., Sohn C., Suetake H., & Aida K. 1997. Gonadotropin-Releasing Hormone and gonadotropin in goldfish and masu salmon. *Fish Physiol. Biochem.* 17: 1-8.
  
- o Levavi-Sivan. B & Avitan. A. 2005.Sequence analysis, endocrine regulation, and signal transduction of GnRH receptors in teleost fish. *Endocrinology* 142 (2005) 67–73.



- o Melamed, P., Gur, G., Rosenfeld, H., Elizur, A., Schulz, R. & Yaron, Z. 2000. Reproductive development of male and female tilapia hybrids (*Oreochromis niloticus* x *O. Aureus*) and changes in mRNA levels of gonadotropin (GTH) and subunits. J. Exp. Zool. 286: 64-75.
- o Millar RP, Wormald PJ, Milton RCL. 1986. Stimulation of gonadotropin release by non-GnRH peptide sequence of the GnRH precursor. Science 232, 68-70.
- o Millar, R., Lu, Z., Pawson, A., Flanagan, C., Morgan, K. & Maudley, S. 2004. Gonadotropin- Releasing hormone receptors. Endocr.Rev.25:235-275.
- o Millar, R. 2005. GnRHs and GnRH receptors. Anim. Reprod. Sci. 88: 5-28.
- o Nabissi M, Soverchia L, Polzonetti-Magni AM, Habibi HR. 2000. Differential splicing of three gonadotropin-releasing hormone transcripts in the ovary of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Biol Reprod 62:1329–1334.
- o Navarrete, S.N.A & Chazaro, O.S.1992. Espectro trófico del charal *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) Pisces Atherinidae del embalse San Felipe Tiacaque, Edo. De México. Rev. Zool. U.N.A.M.3:28-34pp

- o Nicolics K, Mason AJ, Szonyi E, Ramachandran J, Seeburg PH. 1985. A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human GnRH. *Nature* 316, 511-517.
  
- o Onuma, T., Ando, H., Koide, N., Okada, H. & Urano, H. 2005. Effects of salmon GnRH and sex steroid hormones on expression of genes encoding growth hormone/prolactin/somatolactin family hormones and a pituitary-specific transcription factor in masu salmon pituitary cells *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 143:129:141.
  
- o Pati D, Habibi HR 1993 Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding characteristics in the testis of goldfish (*Carassius auratus*). *J Exp Zool* 267:155–163
  
- o Pati, D., Habibi, H.R., 2000. Direct action of GnRH variants on goldfish oocyte meiosis and follicular steroidogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.* 160 (1-2), 75-88.
  
- o Pati D, Habibi, H.R. 2002. Involvement of protein kinase C and arachidonic acid pathways in the gonadotropin-releasing hormone regulation of oocyte meiosis and follicular steroidogenesis in the goldfish ovary. *Biol Reprod* 66:813–822.

- o Russel, L.D., Etlin, R.A., Sinha Hikim, A.P., Clegg, E.D., 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater, FL.
- o Seafon, C., Weinstein, H. & Millar, R. 1997. Molecular mechanism of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocrinol rev.* 18:180-205.
- o Seguin, C., Belanger, A. Cusan, L., 1981. Relative importance of the adenohipophyseal and gonadal sites of inhibitory action of LHRH agonist. *Biol. Reprod.* 24: 889-901
- o Sherwood NM, Parker DB, McRory JE, Lescheid DW. 1994. Molecular evolution of GHRH and GnRH. *Molecular endocrinology of fish*, Vol 13, 29-66.
- o Stefanini et al. 1967. Buffer formaldehyde with picrate. 29-30. In *Histological and Histochemical methods*. Ed. by Kiernan, J. A. Pergamon press. New York. (1990).
- o Sharpe, R.M., 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp. 1363-1434.

- o Sherwood, N., Eiden, L., Brownstein, M., Spiess, J., Rivier, J. & Vale, W. 1983. Characterization of a teleost Gonadotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 2794-2798.
- o Sherwood, N., Grier, H., Warby, C., Peute, J. & Taylor, R. 1993. Gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, in snook *Centropomus undecimalis*, in comparison with forms in black sea bass *Centropristis striata*. *Regul. Pept.* 46: 523-534.
- o Taylor, C.R., Burns, J. 1974. The demonstration of plasma cells and other immunoglobulin-containing cells in formalin-fixed, paraffin embedded tissues using peroxidase-labeled antibody. *J. Clin. Pathol.* 27: 14–20.
- o Uria E, Moncayo E, Garibay R. 1998. Desarrollo y madurez testicular del charal *Chirostoma humboldtianum* (Pisces: Atherinidae) del embalse Huapango, Edo de México. *Hidrobiológica.* 8 (001): 9-18.
- o Uzbekova S, Lareyre JJ, Guiguen Y, Ferriere F, Bailhache T, Breton B. 2001. Expression of sGnRH mRNA in gonads during rainbow trout gametogenesis. *Comp Biochem Physiol B* 129:457–465.

- o Uzbekova S, Lareyre JJ, Madigou T, Davail B, Jalabert B, Breton B. 2002. Expression of prepro-GnRH and GnRH receptor messengers in rainbow trout ovary depends on the stage of ovarian follicular development. *Mol Reprod. Dev* 62:47–56.
- o Wetsel WC, Valenca MM, Merchantaler I, Liposits Z, Lopez FJ, Weiner RI, Mellon PL, Negro-Vilar A. 1991. Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized LHRH-secreting neurons. *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* 92, 8363-8367.
- o White, S., Katen, T., Bond, C., Adelman, J. & Fernald, R. 1995. Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92: 8363-8367.
- o Whitlock, K, Wolf, C. & Boyce, M. 2003. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells arise from cranial neural crest and adeno-hypophysial regions of the neural plate in the zebrafish, *Danio rerio*. *Dev. Bio.* 257: 140-152.
- o Yu, K.L., daCunha-Bastos, J. & Peter, R.E. 1997. GnRH. Neurons: Gene to Behaviour. cap.12.