



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“AISLAMIENTO, SECUENCIACIÓN Y CLONACIÓN DE RECEPTORES A LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GnRH) PRESENTES EN EL CEREBRO ANTERIOR DE *Chirostoma humboldtianum*”

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MARIA DE LOS ANGELES MARIN RUIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS  
(Facultad de Estudios Superiores Iztacala)

COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR  
(Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán)

DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS  
(Facultad de Estudios Superiores Iztacala)

MÉXICO, D.F.

Octubre, 2012



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.





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“AISLAMIENTO, SECUENCIACIÓN Y CLONACIÓN DE RECEPTORES A LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GnRH) PRESENTES EN EL CEREBRO ANTERIOR DE *Chirostoma humboldtianum*”

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MARIA DE LOS ANGELES MARIN RUIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS  
(Facultad de Estudios Superiores Iztacala)

COMITÉ TUTOR: DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR  
(Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán)

DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS  
(Facultad de Estudios Superiores Iztacala)

MÉXICO, D.F.

Octubre, 2012



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 13 de agosto de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **MARÍN RUÍZ MARÍA DE LOS ÁNGELES** con número de cuenta 403017010 con la tesis titulada "**Aislamiento, secuenciación y clonación de receptores a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) presentes en el cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum***", realizada bajo la dirección del (la) **DR. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS**:

Presidente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA  
Vocal: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR  
Secretario: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS  
Suplente: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA  
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN URIBE ARANZABAL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 17 de octubre 2012.

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS**

Al posgrado en **Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional autónoma de México** por haberme permitido ser parte de esta gran institución durante estos años que han sido maravillosos y por la formación académica que mantiene la ciencia cerca de mí.

De igual manera deseo expresar mi inmensa gratitud hacia el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, **CONACYT** por haberme distinguido con una beca de maestría (347001/239958), sin la cual este sueño no hubiese sido posible y al Proyecto **PAPIIT** IN216910.

A los miembros de mi comité tutor por su tiempo, sus consejos, la experiencia y los conocimientos que compartieron conmigo durante todo este tiempo, **Dr. Carlos Gerardo García Tovar** por su apoyo incondicional desde siempre, **Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras** por su increíble disposición e incansable apoyo.

## DEDICATORIAS

A mis padres Nieves Ruiz Concha y Francisco Javier Marin Núñez desde el fondo de mi corazón. Quisiera inventar una nueva palabra que fuera más grande que ¡Gracias!, para poder expresar lo que ustedes me hacen sentir. ¡Gracias! por la muestra de lo eterno, por brindarme entre sus brazos un hogar de puertas abiertas, por contar de mis promesas primero las que cumplo, por ser lo que queda en el vaso aunque el vaso se quede vacío. ¡Gracias! por quererme, hasta cuando solo soy yo. ¡Gracias! por quedarse conmigo. Los amo profundamente.

A mis hermanos Yaneth M. R., Isaac M. R. y Maribel M. R. por la certeza de que somos cuatro, por la confianza de mostrarnos humanos sin el temor de quedarnos solos. Gracias por permitirme contar con ustedes y por dejarme contarme entre ustedes.

Indudablemente a la Dra. María Leonor Quintero Mora, no por habitar mi memoria, sino por habitar mis días, por el respeto y la confianza, por sus tiempo y sus palabras que van conmigo, por hablarme y descubrirme un mundo que no conocía. Me causa un inmenso orgullo decir que la conozco. Por siempre GRACIAS.

A mi tutor principal, Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas por permitirme ser parte de su grupo de investigación, por el tiempo, interés, entusiasmo y conocimientos que compartió conmigo, pero sobre todo por haberme brindado la oportunidad de tener una muy enriquecedora experiencia científica en su laboratorio. Muchas GRACIAS.

A la M. en C. Mónica Chávez M., al M. en C. Alejandro Monsalvo (responsable del servicio de secuenciación automatizado de la UBIPRO/FESI), a mis compañeros del laboratorio 2 de la unidad de morfofisiología de la FES-Iztacala, Beatriz, Edgar, Violeta, Esbe, Marisol y Beto por su apoyo en la realización de este trabajo.

A mi montón de amigas, como un montón de estrellas, por que estamos juntas, la verdad no somos tantas, pero si son muchos años aunque no tantos como historias, por que continuemos juntas compartiendo historias, tiempo, risas y también chismes, digo chistes. Las quiero mucho chicas. Gracias Lili, Lety, Rosy, Cecy, Xitlali y Paty.

## ÍNDICE GENERAL

	Páginas.
<b>1.</b> Resumen	1
<b>2.</b> Introducción	3
<b>3.</b> Antecedentes	6
3.1 Receptores a la hormona liberadora de gonadotropinas	6
3.1.1 Definición y Estructura de GnRH-Rs	6
3.1.2 Clasificación de GnRH-Rs	10
3.1.3 Transducción de señales de los GnRH-Rs	15
3.1.4 Distribución del GnRH-Rs	21
3.2 Ligando del GnRH-R	22
3.3 Modelo de estudio	28
<b>4.</b> Justificación	29
<b>5.</b> Objetivos	30
<b>6.</b> Materiales y Métodos	31
6.1 Fase de campo	31
6.2 Fase de laboratorio	32
6.2.1 Extracción de RNAtotal	32
6.2.2 Obtención de cDNA	32
6.2.3 Clonación de GnRH-Rs	32
6.2.3.1 Diseño de oligos	32
6.2.3.2 Condiciones de PCR	34
6.2.4 Verificación de productos de PCR	35
6.2.5 Purificación de productos de PCR	36
6.2.6 Clonación molecular de productos de PCR	36
6.2.7 Secuenciación de productos de PCR	37
6.2.8 Análisis filogenético de las secuencias obtenidas	38
<b>7.</b> Resultados	41
7.1 Clonación molecular del GnRH-R1	41
7.2 Clonación molecular del GnRH-R2	45
<b>8.</b> Discusión	50
<b>9.</b> Conclusiones	62
<b>10.</b> Perspectivas	63
<b>11.</b> Referencias	64



## INDICE DE FIGURAS

		páginas
<b>Figura 1</b>	Estructura bidimensional del modelo teórico del GnRH-R	5
<b>Figura 2</b>	Señalización intracelular	16
<b>Figura 3</b>	Representación esquemática de GnRH	22
<b>Figura 4</b>	<i>Chirostoma humboldtianum</i> .	28
<b>Figura 5</b>	Estrategia experimental seguida en la secuenciación de GnRH-Rs de <i>Ch. humboldtianum</i> .	40
<b>Figura 6</b>	Posición teórica de los tres oligos usados en la secuenciación del GnRH-R1	42
<b>Figura 7</b>	Geles mostrando los diferentes segmentos del GnRH-R1	43
<b>Figura 8</b>	Secuencia del GnRH-R1	44
<b>Figura 9</b>	Posición teórica de los 4 oligos usados en la secuenciación del GnRH-R2	46
<b>Figura 10</b>	Geles mostrando los diferentes segmentos del GnRH-R2	48
<b>Figura 11</b>	Gel mostrando la ausencia del GnRH-R2 en diferentes órganos	48
<b>Figura 12</b>	Secuencia del GnRH-R2	49
<b>Figura 13</b>	Alineamiento de la secuencia nucleotídica del GnRH-R1	53
<b>Figura 14</b>	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del GnRH-R1	53
<b>Figura 15</b>	Árbol filogenético de GnRH-R1	54
<b>Figura 16</b>	Alineamiento de la secuencia nucleotídica del GnRH-R2	59
<b>Figura 17</b>	Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del GnRH-R2	60
<b>Figura 18</b>	Árbol filogenético de GnRH-R2	61

## INDICE DE TABLAS

		Páginas
<b>Tabla 1</b>	Secuencias empleadas en el diseño de oligos para la clonación del GnRH-R1 de <i>Ch. humboldtianum</i> .	33
<b>Tabla 2</b>	Secuencias empleadas en el diseño de oligos para la clonación del GnRH-R2 de <i>Ch. humboldtianum</i> .	33
<b>Tabla 3</b>	Oligos empleados en la secuenciación del Receptor 1	34
<b>Tabla 4</b>	Oligos empleados en la secuenciación del Receptor 2	35
<b>Tabla 5</b>	Condiciones de trabajo para la clonación del Receptor 1	41
<b>Tabla 6</b>	Presencia de GnRH-R1 en diferentes órganos y meses	42
<b>Tabla 7</b>	Condiciones de trabajo en la clonación del Receptor 2	45
<b>Tabla 8</b>	Presencia de GnRH-R2 en diferentes órganos y meses	46
<b>Tabla 9</b>	Porcentaje de homología de la secuencia nucleotídica de GnRH-R1	52
<b>Tabla 10</b>	Porcentaje de homología de la secuencia nucleotídica de GnRH-R2	56

## 1.- RESUMEN

Los receptores a GnRH (GnRH-Rs) son moléculas clave en el control reproductivo de vertebrados. Su ligando, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es un pequeño péptido que al reconocerse con su receptor estimula la liberación de las hormonas gonadotropinas: la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), las cuales a su vez, alcanzan las gónadas, dónde regulan la gametogénesis y la liberación de esteroides sexuales. GnRH y GnRH-R presentan diferentes isoformas y subtipos respectivamente. Generalmente, en una sola especie se encuentran dos o tres isoformas de GnRH y uno o varios subtipos del GnRH-R. Tanto GnRH como sus receptores presentan una amplia distribución en otros órganos fuera del sistema nervioso central; sin embargo la función reproductiva es la más estudiada. El objetivo de este trabajo, fue aislar y secuenciar los receptores a GnRH presentes en el encéfalo de este charal grande o pez blanco del altiplano a fin de conocer el número y subtipo de receptores a GnRH que participan en el sistema neuroendocrino reproductivo del organismo. Para ello, se colectaron en la laguna de Zacápu, Michoacán, muestras de encéfalo anterior, encéfalo completo, hipófisis y gónadas a partir de las cuales se extrajo RNA total, realizando posteriormente la síntesis de cDNA. Una vez aislados se clonaron dos subtipos (1 y 2) del receptor a GnRH. La secuencia del GnRH-R1 fue de 216 pb y se obtuvo a partir de muestras de encéfalo anterior, encéfalo completo, ovario maduro y testículo. Para el GnRH-R2 se obtuvo una secuencia de 425 pb a partir de muestras de encéfalo anterior de organismos en etapas de recrudescencia tardía-madurez. Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron analizadas mediante el programa BLAST y posteriormente fueron construidos árboles filogenéticos mediante el programa Geneious. La secuencia de 216 pb del GnRH-R1 se encuentra ubicada entre el asa intracelular 3 (ICL3) y el dominio transmembranal 7 (TM7), presentando una similitud del 90% con el GnRH R1B de *Odontesthes bonariensis* y del 88% con *Astatotilapia burtoni*. La secuencia de 425 pb del GnRH-R2 se encuentra ubicada entre las TMs 4 y 7, presentando una similitud del 92% con el GnRH R2A (hipofisiotropico) de *Odontesthes bonariensis* y de 88% con *Seriola dumerilii* y *Morone saxatilis* (hipofisiotropico). Este es el primer reporte de clonación de dos subtipos del GnRH-R en *Ch. humboldtianum*.

## Abstract

The GnRH receptors (GnRH-Rs) are key molecules in the control of reproduction in vertebrates. Its ligands, gonadotropin releasing hormone (GnRH) is a small peptide to be recognized with its receptor stimulates the release of gonadotropin hormones: luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH), which in turn, reach the gonads, where they regulate gametogenesis and sex steroid release. GnRH and GnRH-R have different subtypes and isoforms, respectively. Generally, in a single species are two or three isoforms and one or more subtypes of GnRH-R. Both GnRH and its receptor have a widespread distribution in other organs outside the central nervous system, but reproductive function is the most studied. The aim of this study was to isolate and sequence the GnRH receptors present in the brain of this large chub or white fish from the highlands to ascertain the number and subtype of GnRH receptor involved in the reproductive neuroendocrine system in this organism. Fish were collected in Lake Zacápu, Michoacán, total RNA was extracted from forebrain samples, full brain, pituitary and gonads and subsequently double strand cDNA was synthesized. Once isolated two subtypes (1 and 2) of GnRH-R were cloned. The sequence of the GnRH-R1 was 216 pb and was obtained from samples of forebrain, full brain, mature ovary and testis. For the GnRH-R2 yielded a 425 pb sequence from forebrain samples of organisms in late-stage resurgence maturity. The nucleotide sequences obtained were analyzed using the BLAST program and phylogenetic trees were then constructed using Geneious software. The sequence of 216 pb of the GnRH-R1 is located between the intracellular loop 3 (ICL3) and transmembrane domain 7 (TM7), showing a similarity of 90% with R1B of the GnRH *Odontesthes bonariensis* and 88% with *Astatotilapia burtoni*. The sequence of 425 pb of the GnRH-R2 is located between TMs 4 and 7, showing a 92% similarity to the GnRH-R2A (hypophysiotropic) of *Odontesthes bonariensis* and 88% with *Seriola dumerilii* and *Morone saxatilis* (hypophysiotropic). This is the first report of the sequence of two GnRH-Rs subtypes in *Chirostoma humboldtianum*.

## 2.- INTRODUCCIÓN

La reproducción en vertebrados es controlada por un sistema endocrino organizado jerárquicamente, el eje reproductivo hipotálamo-hipófisis-gónada (HPG). A pesar de la gran variedad de ciclos de vida, estrategias de reproducción y desarrollo, este sistema se encuentra conservado en los vertebrados (Sower et al., 2009). La idea de que las neurohormonas secretadas del cerebro controlan la función de la hipófisis y la secreción de gonadotropinas tomó mucho tiempo en ser aceptada (Benoit y Assenmacher, 1952; Donovan y Harris, 1954); sin embargo, este concepto quedó firmemente establecido hacia finales de la década de los sesenta (Zohar, 2010).

El receptor a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH-R), en asociación con su ligando, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es la molécula central en la iniciación y mantenimiento de la reproducción en vertebrados (Tsai, 2006). La reproducción es controlada por la interacción entre el hipotálamo, la hipófisis anterior y gónadas, donde el hipotálamo secreta pulsos de GnRH, que se une con alta afinidad a su receptor (GnRH-R) presente en los gonadotropos de la hipófisis para estimular la liberación de las hormonas gonadotrópicas; hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) que regulan la gametogénesis y la esteroidogénesis. La expresión, interacción y selectividad de GnRH con su receptor, es por ende, la llave que regula la reproducción (Rispoli et al., 2005; Tello et al., 2008; Sower et al., 2009).

En los organismos multicelulares es indispensable la comunicación entre las células, tanto para que el desarrollo y crecimiento ocurran de manera coordinada, como para la integración funcional del organismo. Las células tienen moléculas conocidas como

receptores, que les permiten detectar a las sustancias reguladoras presentes o producidas en otras células. La membrana biológica constituye la interfase de las células con su medio ambiente y en ellas se encuentra la gran mayoría de los receptores, lo que permite que las moléculas que no pueden atravesarla (mediadores químicos de carácter hidrofílico como proteínas), sean capaces de regular las funciones y el metabolismo celular. El receptor es una molécula tridimensional que posee un sitio de reconocimiento para unir con gran afinidad y especificidad a diversos mediadores químicos, denominados ligandos (Hicks, 2006), una vez que ambos se acoplan el receptor modifica su conformación pasando de un estado inactivo a uno activo, transduciendo una señal al compartimento citoplasmático que culmina en una respuesta biológica específica al estímulo recibido (Norris et al., 1996; Riezman et al., 1998).

Los GnRH-Rs (Fig. 1) pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que se encuentran involucrados en el reconocimiento y transducción de señales tan diversas como; luz, olores, residuos de aminoácidos, nucleótidos, iones, pequeños péptidos y proteínas. Estos receptores controlan la actividad de enzimas, canales iónicos y transporte de vesículas vía la catálisis de guanosín trifosfato-guanosín difosfato (GTP-GDP) por la proteína heterotrimérica G (Bockaert, 1999), debido a que los receptores a GnRH guían la síntesis y liberación de gonadotropinas de la hipófisis anterior, el conocimiento de la estructura de los GnRH-Rs, la interacción con su GnRH (ligando) y su regulación resulta esencial para comprender la fisiología de la reproducción (Guilgur et al., 2006).

## MODELO BIDIMENSIONAL DEL GnRH-R

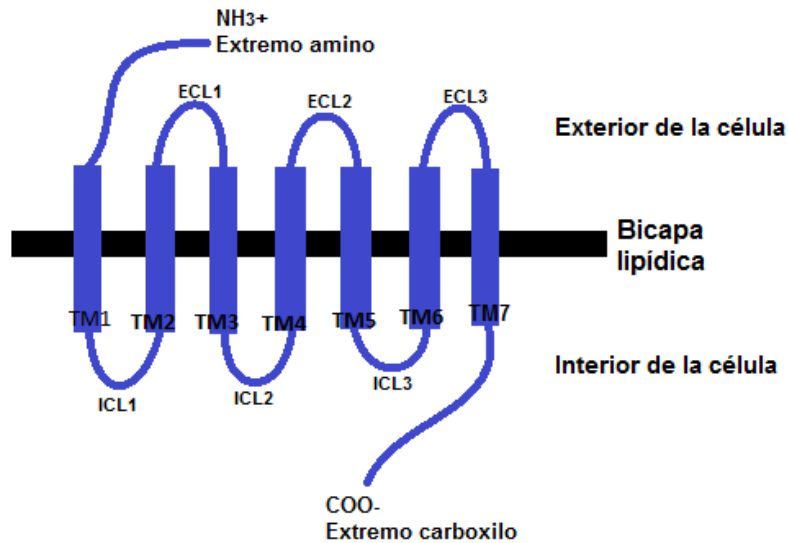


Figura 1: Estructura bidimensional del modelo teórico del GnRH-R, donde TM hace referencia a los dominios transmembranales, ICL (Intracellular Loop) hace referencia a las asas intracelulares de 1-3 y ECL (Extracellular Loop) hace referencia a las asas extracelulares de 1-3 (Modificado de Millar, 2004).

## 3.- ANTECEDENTES

### 3.1 Receptores a la hormona liberadora de gonadotropinas

#### 3.1.1 Definición y Estructura de GnRH-Rs

La evolución de los organismos multicelulares ha sido altamente dependiente de la capacidad de desarrollo de sus células para comunicarse con otras células y con su medio ambiente, para ello, los mensajeros producidos por las células requieren de la presencia de moléculas en las células blanco que identifiquen a esos mensajeros y los discriminen de otros. Este tipo de moléculas que distinguen un tipo de mensajero son denominados receptores y puede haber receptores en membrana o en el interior de la célula. En el caso particular de las GnRHs su receptor pertenece a una superfamilia altamente conservada de proteínas integrales de membrana, conocidas como receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Estos receptores muestra tres principales dominios funcionales: un dominio extracelular N-terminal, 7 dominios  $\alpha$ -hélices transmembranales (TMs) conectados por asas hidrofílicas intra y extracelulares y un dominio citoplasmático carboxilo terminal. Los dominios extracelulares, en especial el asa extracelular 3 (EC3) y las regiones superficiales de las TMs son usualmente involucradas en eventos de reconocimiento del ligando. Las TMs están involucradas en la conformación del receptor, y el C-terminal, junto con las regiones citoplasmáticas de las TMs, median la unión de los efectores, la propagación de los eventos de señalización, la desensibilización e internalización del receptor (McArdle et al., 2002; Millar et al., 2004, Chen, 2008, Moncaut et al., 2005a).

La clonación inicial del GnRH-R de mamífero realizada por Kakar en 1992 se basó en esta homología de los segmentos transmembranales de los GPCRs, usando esta estrategia Tsutsumi y colaboradores en 1992 reportaron por primera vez la secuencia de un GnRH-R de murino a partir de la línea celular tumoral de células gonadotropas  $\alpha$ T3-1 de hipófisis de ratón. Esta secuencia fue confirmada, y posteriormente se clonaron estos receptores de rata, humano, oveja, vaca y cerdo (Millar, 2004). La primera caracterización del receptor a GnRH de peces se hizo en bagre africano en 1997 (Lethimonier, 2004).

En la hipófisis la acción de GnRH es mediada a través de una unión de alta afinidad con el receptor a GnRH, el cual es un receptor clase A parecido al receptor de la rodopsina (GPCR). Los receptores a GnRH han sido clasificados típicamente como tipo I (sin el tallo C-terminal) y como tipo II (con el tallo C-terminal) (Silver et al., 2005; Guilgur et al., 2006). El receptor tipo I de GnRH es el único de todos los GPCRs que ha perdido el dominio intracelular (C-terminal) altamente conservado, dicha estructura ha mostrado ser un elemento vital requerido para varias funciones, tales como el acoplamiento a proteínas G, la activación de segundos mensajeros, la unión al ligando y la expresión en la superficie celular (Koenig y Edwardson, 1997; Heding et al., 1998; Blomenrohr et al., 1999; Bockaert et al., 2003; Ronacher et al., 2004). Desde la primera clonación exitosa del transcrito del receptor a GnRH de ratón (Tsutsumi et al., 1992) más de 83 cDNAs de receptores a GnRH han sido clonados (Silver et al., 2005). Fue aislado el transcrito total que codifica el receptor funcional tipo II de GnRH de la hipófisis de *Petromyzon marinus*. Este estudio fue el primero en identificar el mRNA de un agnato el cuál es el más antiguo linaje de vertebrados y es considerado el linaje basal de todos los vertebrados. El receptor clonado conserva las características estructurales conocidas para los GnRH-Rs y notablemente



incluye un dominio intracelular de aproximadamente 120 aminoácidos, el más grande dominio C-terminal de cualquier receptor a GnRH identificado hasta ahora. Los GnRH-Rs son de los más pequeños GPCRs debido en parte a que el GnRH-R1 de mamíferos carece del tallo amino terminal y también por que estos receptores tienen un dominio extracelular amino terminal muy corto de solo 35 residuos de aminoácidos. Debido a estas dos características en roedores este receptor tiene 327 aminoácidos, mientras que los GnRH-Rs de otros mamíferos contienen un aminoácido adicional en la segunda asa extracelular (Rispoli, 2005).

El modelo de la estructura de la familia de GPCRs se basa en los estudios de cristalografía de rayos-X de la bacteriorodopsina realizado por Pebay-Peyroula en 1997 y Palczewski en el 2000. Los dominios transmembranales de los GnRH-Rs fueron modelados por homología con otros GPCRs relacionados, sin embargo su estructura única no ha sido determinada debido a diferencias en la longitud de las regiones terminales y diferencias en la composición de las asas (Rispoli, 2005).

Los GnRH-Rs son proteínas que ejercen su función fisiológica en la superficie de la membrana celular, por ende son proteínas de exportación (fuera/ sobre la célula). Todas las proteínas inicialmente son mRNAs maduros que migran del núcleo hacia el retículo endoplásmico (RE) donde son traducidos a secuencias de aminoácidos sobre los ribosomas.

La vida de los GnRH-Rs por ende inicia en el retículo endoplásmico donde son sintetizados, plegados y ensamblados, posteriormente los receptores plegados correctamente son empacados en vesículas COPII y enviados al aparato de Golgi mediante el ER-Golgi (ERGIC, por sus siglas en inglés), durante su migración los receptores pasan

por modificaciones post-traduccionales (glicosilación) hasta alcanzar un estado maduro. Los receptores maduros son llevados de la red del trans Golgi (TNG) a su destino funcional en la membrana plasmática. El transporte de las proteínas del aparato de Golgi a la superficie celular es convencionalmente considerado un proceso constitutivo (Dong, 2007). Recientes estudios sugieren que de modo similar a lo que ocurre con el transporte fuera del RE, el transporte de los GPCRs fuera del aparato de Golgi es un proceso regulado, de cualquier modo, las secuencias específicas de los GPCRs para salir de Golgi aún no han sido identificadas (Dong, 2007).

El eficiente transporte a la superficie celular es mediado por el tallo C-terminal de aproximadamente 50 residuos de aminoácidos presentes en el GnRH-R de bagre pero no en el GnRH-R de humano. En adición el GnRH-R de humano tiene un residuo de lisina extra en la posición 191, la cual está ausente en GnRH-Rs de rata y ratón. La lisina 191 parece estabilizar la conformación proteínica inhibiendo la formación intramolecular de enlaces de cisteína (Dong, 2007).

Los GnRH-Rs se caracterizan por ser proteínas pequeñas en comparación con otros GPCRs (GnRH-R; humano 328 aminoácidos, ratas y ratones 327 aminoácidos), esto ha facilitado la realización de diversos estudios mutacionales que han permitido conocer el mecanismo de transporte de estos receptores, además se ha observado que la mayoría de las mutaciones en estas proteínas (19 mutantes examinadas) causa defectos en este mecanismo de transporte (Conn, 2009). Mutaciones en el GnRH-R humano causan la pérdida de la función de éste, ya sea debido a alteraciones en el reconocimiento del ligando o en la interacción con el ligando.

### 3.1.2 Clasificación de GnRH-Rs

GnRH ejerce su función al unirse a los receptores acoplados a proteínas G. Inicialmente, la presencia de múltiples formas de GnRH, sugirió que podrían existir también múltiples formas del GnRH-R en una especie dada, como resultado de una evolución paralela entre ligandos y receptores. Estudios posteriores demostraron que múltiples formas de GnRH-Rs son expresadas en especies de vertebrados. Cabe mencionar que la relación filogenética entre los GnRH-Rs no está del todo clara y su nomenclatura es confusa, en contraste con la clara relación filogenética entre los tres ligandos, los GnRH-Rs parecen tener un pasado evolutivo más complejo.

Diversos grupos de investigadores han hecho varios intentos para clasificar a estos receptores a GnRH, a fin de establecer la nomenclatura, función y relación de estos receptores.

Troskie et al., (1998), analizó la relación filogenética del dominio extracelular (EC3) de los GnRH-Rs y propuso que todos los receptores de los vertebrados pueden ser agrupados en dos principales tipos: tipo I, que incluye los subtipos IA y IB, en el que se encuentran el receptor hipofisiario de mamíferos y los receptores de tetrápodos y especies de teleósteos. El tipo II incluye solo receptores de tetrápodos. Sin embargo, con el hallazgo de nuevos GnRH-Rs de diferentes especies de vertebrados, las relaciones filogenéticas han debido ser re-evaluadas, por lo que, en el 2004 Millar clasificó a los receptores a GnRH de vertebrados dentro de tres grupos en base a criterios como: su afinidad hacia un ligando en particular, la organización de sus genes y la estructura de la región C-terminal. Subsecuentes estudios han demostrado de los GnRH-Rs son promiscuos por lo que su afinidad hacia algún ligando

en particular no se encuentra evidenciada adecuadamente. Por otra parte se han identificado dos grupos principales de GnRH-Rs basados en el tamaño del tallo C-terminal, sugiriendo que esta característica está implicada en la inducción de diferentes cascadas de transducción, de igual modo se ha identificado una tendencia al acortamiento progresivo del tallo a fin de modular la desensibilización de los receptores o su internalización.

Años más tarde, retomando la idea de Troskie, otros grupos de investigadores (Chen, 2008; Flanagan, 2007) sugirieron la existencia de dos grupos basados en la secuencia de aminoácidos en el asa extracelular 3 (EC3). Flanagan et al. (2007), propone dos grupos principales de GnRH-Rs (GnRH-Ra y Rb), basado en su relación filogenética. Este análisis propone 4 subfamilias (a1, a2, b1 y b2), correspondientes a un grupo de 3 aminoácidos conservados en el asa extracelular EC3 (PEY, SDP, PPS y SHS). El modelo filogenético de GnRH-Rbs incluyendo algunos teleósteos y todos los tetrápodos es divergente, se encuentra b1 solo en tetrápodos y b2 en no mamíferos, mientras que GnRH-Ras separa a los no mamíferos en a1 y los mamíferos en a2 (Chen, 2008). La comparación sistemática de la estructura de los GnRH-Rs mostró no solo el dominio EC3 conservado a través de las 4 subfamilias, sino también las diferencias en el tamaño de la región C-terminal. Generalmente, GnRH-Ra tiene un tallo C-terminal más corto que GnRH-Rb. Una excepción en teleósteos es *Oreochromis niloticus* con el tallo C-terminal de GnRH-Rb2 (conocido como GnRH-R1) la mitad más corto que el tallo C-terminal de GnRH-Ra1 (conocido como GnRH-R2).

Dentro del linaje de los teleósteos existen 2 tipos principales de GnRH-Rs cada uno de los cuales incluye 2 o 3 subtipos como se ha evidenciado en pez globo, pez cebra, pez dorado y bagre. Algunas especies individuales de vertebrados que expresan múltiples GnRH-Rs se

mencionan a continuación: tres GnRH-Rs en rana toro, *Rana catesbeiana* (Wang et al., 2001a) y en medaka, *Oryzias latipes* (Okubo et al., 2001; Okubo et al., 2003); dos en primates (Millar et al., 2001; Neill et al., 2001), en el pez dorado, *Carassius auratus* (Illing et al., 1999) y en el bagre africano, *Clarias gariepinus* (Bogerd et al., 2002); y en lubina europea, *Dicentrarchus labrax* (Moncaut et al., 2005a). Por ejemplo 3 de los receptores del pez globo (GnRH-R1, GnRH-R2 y GnRH-R3), son subtipos de los receptores tipo 1, mientras que los GnRH-R4 y GnRH-R5 pertenecen a los receptores tipo 2. En pez cebra se han encontrado cuatro secuencias para estos receptores, dos de las cuales pertenecen a los receptores tipo 1 y las otras dos secuencias pertenecen a los receptores tipo 2. Interesantemente en pez dorado y bagre se han clonado dos receptores tipo 2. En contraste a los dos receptores identificados en medaka y ciclidos africanos, dos Acanthopterygii son clasificados dentro de las dos principales ramas. También, los GnRH-Rs han sido caracterizados en protocordados y agnatos. Recientemente un GnRH-R fue clonado de lamprea, *Petromyzon marinus*, que pertenece al grupo de vertebrados más antiguos (Silver et al., 2005).

Hasta el momento los ejemplos de especies que exhiben estos dos tipos de receptores son: anguilliforme, cypriniforme, salmoniforme, beloniforme, perciforme y tetraodontiforme, mostrando por ende, una amplia distribución de los dos tipos de receptor, ya que también se han caracterizado en mamíferos (Millar, 2002) y 3 en bullfrog (Wang et al., 2001a).

La presencia de diferentes tipos y subtipos de GnRH-Rs en una sola especie de pez se ha tratado de explicar mediante la hipótesis de ciclos de duplicación génica que pudieron haber ocurrido en diferentes grupos de cada linaje (Guilgur, 2006) además que aumentan las dudas sobre si estos receptores tienen funciones distintas o redundantes. Para responder

esto es necesario estudiar la estructura de los genes, su regulación, especificidad, selectividad de ligando y su distribución en tejidos. Actualmente no existe una firme correlación entre los subtipos de receptores y una función fisiológica particular.

La organización de los genes de GnRH-R ha sido bien determinada en medaka (Okubo et. al., 2001) anguila y trucha (Mandigou et. al., 2000). Los genes que codifican a los receptores tipo 1 consisten en 3 exones separados por dos intrones, los genes del receptor tipo 2 tienen una estructura más diversa, sin embargo se ha llegado a la conclusión de que la estructura de los genes que codifican para GnRH-Rs presentan diferencias en el número y tamaño de exones y en los componentes del promotor (Lethimonier, 2004).

En muchos GPCRs, la función y estructura de la proteína es estabilizada por un puente disulfuro formado por cisteínas conservadas en la primera y segunda asa extracelular. Como en muchos GPCRs es sabido que el puente disulfuro es importante en la función de GnRH-R. El GnRH-R contiene cisteínas en la primer asa extracelular, dos cisteínas en la segunda asa extracelular y una en el dominio amino terminal. Mediante estudios de mutagénesis se ha demostrado la presencia de puentes disulfuro extracelulares entre C<sup>114</sup> (Cisteína 114) y C<sup>119</sup> en el receptor de ratón y entre C<sup>14</sup> y C<sup>200</sup> del receptor de humano. La ruptura de este puente disulfuro reduce drásticamente la habilidad del receptor para reconocer a su ligando. (GnRH) (Rispoli, 2005).

De modo consistente con otros GPCRs, el GnRH-R bovino, ovino y humano incluyen dos sitios potenciales de glicosilación: N<sup>18</sup> y N<sup>102</sup>. El receptor de roedor contiene los mismos sitios potenciales de glicosilación y un adicional sitio en el amino terminal, N<sup>4</sup>. En el GnRH-R de murino se han encontrado resultados que sugieren que sitios en el amino

terminal son glicosilados. Las mutaciones en estos dos sitios no afectan la afinidad del receptor por su ligando, ni la habilidad del receptor para estimular la fosfolipasa C. Parece que estos sitios de glicosilación en los GnRH-Rs son requeridos para la estabilidad del receptor y no tanto para su transporte a la superficie celular (Rispoli, 2005).

Los GnRH-R2 tienen gran afinidad por el GnRH2 y poseen un tallo C-terminal de longitud variable; este grupo contiene todos los receptores conocidos de no-mamíferos vertebrados (bagre, pez dorado, pollo, rana africana). En adición a los GnRH-Rs tipo 2 de primate. Los GnRH-Rs tipo 1 y 2 muestran considerable homología en sus secuencias en un número de áreas clave, incluyendo puentes disulfuro conservados entre la primera y la segunda asa extracelular y conservación de aminoácidos implicados en la unión del ligando y el acoplamiento de efectores. Hay sin embargo importantes diferencias estructurales: por ejemplo del GnRH-R1 su función es dependiente de la interacción de los residuos de asparagina y aspartato en las regiones transmembrana 2 y 7 (N<sup>87</sup> y D<sup>318</sup> en el hGnRH-R) pero estos no son conservados en el GnRH-R tipo 2 (donde el ácido aspártico puede ser encontrado en ambas posiciones). De cualquier modo el más intrigante rasgo es la ausencia del tallo C-terminal en el GnRH-R tipo 1. Este tallo se encuentra presente en todos los otros GPCRs clonados y es crucial para el acoplamiento y regulación del receptor. Su ausencia en el GnRH-R1 implica que estos receptores han sido sometidos a un reciente periodo de evolución molecular rápidamente acelerada y proveen una oportunidad única para estudios de comparación para investigar la estructura de los GPCRs en un contexto de receptores normales no-mutados (McArdle, 2002).

### 3.1.3 Transducción de señales de los GnRH-Rs

La transducción de señales se puede definir como el proceso por el que una señal externa (un regulador químico o estímulo físico) inducen una cascada de acontecimientos internos que producen una respuesta celular. En esta larga cadena de interacciones proteína-proteína participan segundos mensajeros, enzimas y canales iónicos que propagan la señal, mediante cascadas o redes complejas de reacciones y procesos bioquímicos, que modifican la expresión génica y la actividad celular (Hicks, 2006).

Los miembros de la familia de GPCRs parecidos a la rodopsina, tienen un alto grado de conservación sugiriendo que tienen una estructura y mecanismo de activación similar entre ellos. Los ligandos y agonistas interactúan con la cara extracelular del receptor induciendo un cambio conformacional y pasándolo a un estado activo. Esta conformación activa propaga una señal de transducción vía asociación con proteínas G. Aunque los conocimientos de la interacción entre GnRH su receptor y la proteína G son muy rudimentarios. Algunos sitios específicos del GnRH-R que interaccionan con el ligando y la proteína G han sido definidos (Rispoli, 2005). La activación de este receptor es típicamente seguida por su desensibilización e internalización, este proceso involucra la desensibilización del receptor, vía fosforilación, que es estimulada por la unión del agonista y es normalmente rápida (segundos a minutos) y puede ser mediada por cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs por sus siglas en inglés) que regulan a segundos mensajeros como las proteína cinasas C ó A (PKC ó PKA). Para muchos receptores esta fosforilación facilita o estabiliza la asociación con  $\beta$ -arrestinas, lo cual dificulta por impedimento estérico la unión de la proteína G, previniendo la activación de los efectores.



Este efecto específico para receptores activados, es llamado desensibilización homóloga del receptor (McArdle 2002).

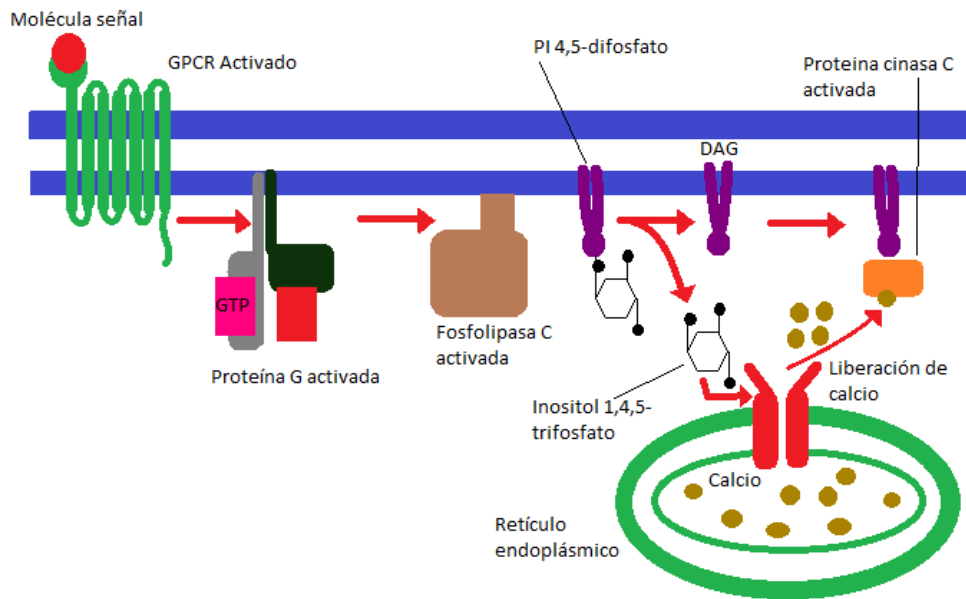


Figura 2: Ruta principal de señalización intracelular (segundos mensajeros) que se desencadena tras la activación del GPCR acoplado a proteínas Gq (Modificado de Alberts, 2008).

Las  $\beta$ -arrestinas también actúan como adaptadores cuyos blancos son los GPCRs desensibilizados para internalización. Los GPCRs son internalizados de la superficie celular por endocitosis muy a menudo vía vesículas recubiertas de clatrina (CCVs, por sus siglas en inglés). La formación de estas vesículas es normalmente controlada por un collar de dinamina el cual separa las vesículas de la membrana plasmática por estrechamiento del cuello de la vesícula. Después de la internalización puede ser reciclado a la superficie celular o convertido en blanco de la degradación lisosomal. En adición a los GPCRs, las  $\beta$ -

arrestinas unen varias proteínas involucradas en el reciclamiento y señalización del receptor. Adicionalmente se cree que las  $\beta$ -arrestinas funcionan como andamios mediante el ensamble de un complejo que incluye a los GPCRs y un número de proteínas controlando la internalización del receptor por endocitosis (como activador de la proteína (AP)-2 y clatrina) y la activación de MAPK (como Src). Estas últimas proteínas son de particular interés por que ahora se piensa que sirven como reguladores de dos diferentes modos de señalización del receptor, por que un receptor desensibilizado en términos de activación de proteínas heterotriméricas G actualmente puede ser activado vía  $\beta$ -arrestinas mediando la activación de MAPK. El reconocimiento y activación de  $\beta$ -arrestinas involucra la asociación con varios sitios en el GPCR, aunque los aminoácidos fosforilados que facilitan la unión de  $\beta$ -arrestina son casi siempre localizados en el tallo carboxilo terminal del GPCR (McArdle, 2002).

Para los GPCRs que unen pequeños péptidos, la interacción con el ligando parece ocurrir dentro de los dominios transmembranales, los cuales forman una bolsa hidrofílica. La propuesta respecto a la unión de GnRH dentro de la bolsa parece involucrar residuos específicos del TM3 (K<sup>121</sup>) y el TM2 (D<sup>98</sup> y N<sup>102</sup>). Estudios mutacionales han demostrado que D<sup>98</sup> y K<sup>121</sup> interaccionan específicamente con H<sup>2</sup> de GnRH-1(pE<sup>1</sup>-H-W-S-Y-G-L-R-P-G<sup>10</sup>-NH<sup>2</sup>). El reemplazo de D<sup>98</sup> con un residuo cargado positivamente elimina la formación del puente de hidrógeno con H<sup>2</sup> pero no elimina todas las interacciones con GnRH-1. Mutaciones similares de K<sup>121</sup> afectan solo la afinidad de los agonistas pero no de los antagonistas. El asa extracelular 3 (ECL3) también ha sido implicada en el reconocimiento de GnRH, específicamente el E<sup>301</sup> en murino y D<sup>302</sup> en el ECL del receptor humano confiere especificidad por R<sup>8</sup> en GnRH1 y potencialmente induce a GnRH1 a adquirir una

conformación activa, recientes trabajos de sobre la clonación de una segunda forma de GnRH, GnRH-2 (H<sup>5</sup>-W<sup>7</sup>-Y<sup>8</sup>), el cual se ha demostrado que se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro de primates indica una potencial necesidad del GnRH-R para distinguir entre las diferentes formas de GnRH presentes en forma natural. En el GnRH-R humano ha sido propuesto que D<sup>302</sup>, S<sup>301</sup> y P<sup>303</sup> funcionan orientando la cadena en una conformación necesaria para interaccionar preferencialmente con R<sup>8</sup> en GnRH1. Mutaciones en la secuencia aminoacídica del GnRH-R (P<sup>303</sup>, A ó S<sup>301</sup> P/P<sup>303</sup>, G) resultan en un decremento en la afinidad por GnRH1 pero no por análogos de GnRH con R<sup>8</sup> sustituida GnRH-2. Investigaciones utilizando un péptido específico para los residuos 293-302 del GnRH-R murino resultan en el plegamiento de GnRH-R1 en una conformación activa, proponiendo que esta interacción con GnRH estabiliza la ECL3 conduciendo a cambios conformacionales en las TMs necesarios para la activación de las proteínas G y la subsecuente transducción de señales (Rispoli, 2005).

Ha sido sugerido que los GnRH-Rs activan diferentes rutas de señalización por acoplamiento a múltiples proteínas G (G<sub>q11</sub>, G<sub>s</sub> y G<sub>i</sub>), la activación de las proteínas G<sub>s</sub> y G<sub>i</sub> ha sido encontrada en todos los sistemas experimentales y su importancia en la señalización de GnRH-Rs aún no ha sido determinada. Recientes investigaciones han establecido que lo GnRH-Rs inician estas cascadas a través de una interacción exclusiva con proteínas G<sub>q11</sub>. Esto es consistente con la información derivada usando células αT3-1 que indican que los GnRH-Rs activan la fosfolipasa Cβ (PLCβ) (Rispoli, 2005).

La clásica visión teórica del receptor que tiene solo dos estados; activo e inactivo, en el cual el agonista estabiliza el estado activo para incrementar la señalización intracelular, resulta inconsistente con los resultados encontrados en experimentos recientes que sugieren que

diferentes agonistas pueden estabilizar diferentes estados activos, los cuales pueden seleccionar diferentes rutas de señalización. Este concepto fue propuesto hace casi una década por Kenakin en 1995, desde entonces substanciales experimentos y consideraciones teóricas han apoyado el concepto de que los receptores oscilan entre numerosas conformaciones, algunas de las cuales son selectivas para ciertos agonistas y rutas de señalización. Esto parece indicar que la conformación del receptor determina el ligando que se une y por ende la cascada de señalización que se activa, aunque cabe mencionar que dicha influencia es bidireccional, así un ligando específico ( $L_1$ ) se unirá a una conformación particular del receptor ( $R_1$ ), la cuál a su vez activará un complejo proteínico particular ( $SC_1$ ). Inversamente un complejo de señalización ( $SC_1$ ), estabilizará una conformación del receptor ( $R_1$ ) que a su vez unirá selectivamente un ligando ( $L_1$ ). Evidencia directa de las múltiples conformaciones de GPCRs fueron provistas por la técnica de fluorescence lifetime spectroscopy del  $\beta_2$ -adrenoreceptor unido covalentemente con una sonda fluorescente (Millar y Pawson, 2004).

Los GnRH-Rs son clasificados en la subfamilia 1b de GPCRs, esta subfamilia es activada por péptidos cortos que interactúan con las asas extracelulares y el dominio N-terminal, sin embargo se ha propuesto que el carboxilo terminal de este péptido interacciona con una cavidad formada por las TMs de la 3 a la 6, esta unión causa el cambio conformacional que activa al receptor (Bockaert, 1999). Una gran variedad de mecanismos moleculares permiten que diversos ligandos activen el dominio principal del receptor.

Mediante estudios de baja resolución de difracción de electrones se ha analizado la orientación de las  $\alpha$ -hélices transmembranales. Análisis de bioquímicos y de mutagénesis usando como modelo el GPCR de la rodopsina revelaron que el interruptor de la

conformación inactiva a la activa está asociada con un cambio en la orientación relativa de la TM3 y la TM6 (con una rotación de la TM6 y una separación de la TM3), la cual desenmascara el sitio de reconocimiento de la proteína G. En la familia 1 de GPCRs, un residuo (D) en la TM2 y un tripéptido (DRY o ERW) en la interfaz de TM3 y ICL2 son importantes para la activación del receptor, estos residuos no son conservados en otras familias de GPCRs, se puede concluir que, o bien el cambio de la conformación del dominio principal, o los acontecimientos moleculares que conducen a estos cambios no se han conservado entre las diferentes familias (Bockaert, 1999).

El cambio en la conformación del dominio principal generalmente afecta la conformación de las asas intracelulares ICL2 e ICL3 (las cuales están directamente vinculadas a TM3 y TM6 respectivamente) que constituyen uno de los sitios clave para el reconocimiento y activación de la proteína G. En receptores a GnRH, el asa ICL1 es esencial para la activación de Gs pero no de Gq. Esto ilustra perfectamente la diversidad de las soluciones que han sido seleccionadas durante la evolución para asumir un buen acoplamiento de las proteínas G. Ha sido propuesto que el carboxilo terminal se une a la subunidad  $\alpha$  de la proteína G en una bolsa constituida por estas asas intracelulares de los GPCRs de las diferentes familias (Bockaert, 1999).

### 3.1.4 Distribución del GnRH-Rs

Los GnRH-Rs también son expresados en varios sitios extrahipofisarios y pueden mediar directamente la inhibición de la proliferación de células cancerosas dependientes de esta hormona.

El análisis de la expresión de los genes de GnRH-Rs apoya la idea de que la actividad de GnRH no está limitada al sistema nervioso central y la hipófisis. Los GnRH-Rs se expresan en tejidos periféricos relacionados con los sentidos, reproducción y homeostasis sugiriendo su participación en estas funciones, aunque esta hipótesis aún requiere ser probada (Guilgur, 2006).

La distribución de los receptores a GnRH en el sistema nervioso central y en la hipófisis es evidente en cada organismo. En algunos casos particulares, como en rana toro y bagre, se han encontrado dos tipos de receptores. La expresión diferencial ha sido descrita en estos tejidos. En *Oreochromis niloticus*, se expresan tres receptores a GnRH, que a menudo son coexpresados en células lactotropas, somatótropas, tirotropas, melanotropas, corticotropas y células de somatolectina (Parhar et al., 2005). Los receptores de pez dorado son ambos altamente expresados en gonadotropas y un poco en somatótropas (Illing et al., 1999). En lubina el receptor a GnRH 2 está evidentemente expresado en todas las células LH y algunas FSH pero no en somatótropas (González-Martínez et al., 2004a).

### 3.2 Ligando del GnRH-R (GnRH)

Al comienzo de los años setenta, dos grupos de investigadores simultáneamente reportaron el aislamiento en cerdo y oveja de un factor de liberación de LH (Amoss et al., 1971; Matsuo et al., 1971). Este decapeptido fue llamado LHRH (hormona liberadora de la hormona luteinizante) y su estructura primaria fue identificada como pE-H-W-S-Y-G-L-R-P-G-NH<sup>2</sup>. Después se demostró que este decapeptido también estimula la liberación de FSH, por ello el nombre de LHRH fue reemplazado por GnRH, hormona liberadora de gonadotropinas (Breton et al., 1971).

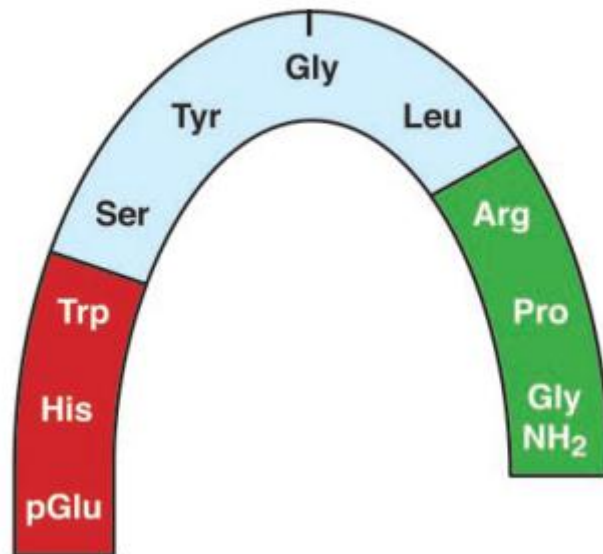


Figura 3: Representación esquemática bidimensional de GnRH de mamíferos en la conformación que se reconoce en su receptor (imagen tomada y modificada de Millar et al., 2004). GnRH es un decapeptido producido por neuronas presentes en el hipotálamo anterior, secretada en la hipófisis por las terminales nerviosas que la inervan, donde se une a su receptor (GnRH-R) presente en las gonadotropas, estimulando la síntesis y liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). Estas gonadotropinas entran a la circulación periférica estimulando en gónadas la síntesis y liberación de esteroides sexuales y la maduración de los gametos.

La primer GnRH aislada de peces fue salmón GnRH (Sherwood et al., 1983). La familia de las GnRHs ha incrementado rápidamente desde 1971, ahora alcanza un total de 28 isoformas encontradas, 15 en vertebrado y 13 en invertebrados (Kavanahug et al., 2008; Tsai and Zhang, 2008; Zhang et al., 2008). De todos los vertebrados, los peces teleósteos representan el grupo con el mayor número de isoformas para GnRH.

Las diferentes isoformas de GnRH inicialmente fueron nombradas dependiendo de la especie de la cual fueron aisladas por primera vez, sin embargo con el paso del tiempo al aislarse más GnRHs se encontró que esta nomenclatura resultaba confusa por dos criterios, el primero es que una misma isoforma de GnRH puede estar presente en varias especies, y el segundo es que en una sola especie se presentan diferentes isoformas de GnRH. A fin de evitar esta confusión, en 1998, White et al., propuso un árbol filogenético de prepro-hormonas a GnRH, en el cuál se clasificó a las GnRHs en tres grupos o sistemas (GnRH1, GnRH2 y GnRH3), cabe mencionar que la topología de este árbol no se ha visto afectada por la inclusión de nuevas secuencias por lo que actualmente se encuentra ampliamente aceptado (Okubo et al., 1999, 2000a; Okubo y Aida, 2001; Dubois et al., 2002; Lethimonier et al., 2004; Vickers et al., 2004). En este análisis filogenético se agrupó como GnRH1 a las variantes hipofisiotrópicas, las cuales son expresadas por neuronas localizadas en el área preóptica de anfibios, mamíferos y peces. El segundo sistema (GnRH2) incluye a todas las GnRH expresadas en el cerebro medio (sinencéfalo/mesencéfalo) de vertebrados, desde peces a mamíferos. El tercer sistema llamado GnRH3 comprende todas las isoformas de sGnRHs (isoforma de salmón), encontrada únicamente en peces y es expresada en neuronas de la región del nervio terminal olfatorio y telencéfalo (Fernald y Withe, 1999; White et al., 1995). (Gothilf et al.,



1996; Okuzawa et al., 1997; Fernald y White, 1999; Okubo et al., 2000a; Stefano et al., 2000; González-Martínez et al., 2001., Amano et al., 2002; Zmora et al., 2002; Vickers et al., 2004).

Todos los vertebrados estudiados hasta la fecha presentan al menos dos isoformas de GnRH. Existe un creciente número de especies de teleósteos dónde han sido identificadas y localizadas tres variantes de GnRH, todas estas especies expresan GnRH2, GnRH3 (sGnRH) y una tercera isoforma llamada GnRH1 que incluye; la de mamífero (mGnRH), la de conejillo de indias (gpGnRH), la GnRH-I de pollo (cGnRH-I), la de rana (frGnRH), la de bagre (cfGnRH), la de lubina (sbGnRH), la de arenque (hrGnRH), la de medaka (mdGnRH) y la del pez blanco (wfGnRH). (Okubo y Nagahama, 2008), es decir que esta isoforma puede ser considerada específica para cada grupo: hrGnRH en Clupeiformes, wfGnRH en Salmoniformes, pJGnRH en Atheriniformes, Synbranchiformes, Beloniformes y Cyprinodontiformes y sbGnRH en Characiformes, Perciformes, Pleuronectiformes y Tetraodontiformes (Somoza et al., 2002; Lethimonier et al., 2004; Sherwood y Adams, 2005).

Aunque la distribución de las tres isoformas de GnRH fue inicialmente considerada como restringida a áreas específicas del cerebro, González-Martínez et al. (2001) describe por primera vez en *Dicentrarchus labrax*, una distribución sobrepuesta de sbGnRH y sGnRH (sistemas 1 y 3 respectivamente) expresadas por células de los bulbos olfatorios de la región preóptica, desde entonces esquemas de distribución similares han sido reportados en muchas otras especies, incluyendo el pez blanco, *Coregonus clupeaformis* (Vickers et al., 2004), la corvina del atlántico, *Micropogonias undulatus* (Mohamed et al., 2005), el cíclido sudamericano *Cichlasoma dimerus* (Pandolfi et al., 2005) y la perca regia *Argyrosomus*

*regius* (Confente et al., 2005). En este contexto y aunque en muy pocas especies se ha analizado a detalle la localización de estas neuronas, la sobreposición de las neuronas que expresan GnRH 1 y 3 en teleósteos parece ser más una regla que una excepción (Guilgur et al., 2006). Por otra parte diversos estudios han demostrado la presencia de GnRH fuera del sistema nervioso central, por ejemplo, en *Ch. humboldtianum* recientemente se ha encontrado sGnRH en gónadas asociado a la gametogénesis temprana (datos sin publicar, Dr. Cárdenas R.).

A fin de encontrar una relación evolutiva entre los sistemas de GnRH, O'Neill et al. (1998), Okubo y Aida (2001) y Dubois et al. (2002) han sugerido que la isoforma de GnRH3 se pudo originar a partir de GnRH1 mediante un ciclo de duplicación génica. Los sistemas 1 y 2 se encuentran evolutivamente conservados puesto que secuencias correspondientes a estos sistemas han sido encontrados en organismo que van desde peces hasta vertebrados terrestres, indicando que estas ramas son ancestrales y emergen antes de la divergencia de estos grupos. La rama 3 incluye solamente a salmón GnRH y únicamente se ha encontrado en peces, por lo que se piensa que el linaje de la región del cerebro anterior se divide en dos grupos de parálogos, el de sGnRH (grupo 3) presente únicamente en especies de teleósteos y la forma hipofisiotrópica (grupo 1). Dos hipótesis han sido propuestas para explicar la existencia de este tercer sistema de GnRH. Existe la posibilidad de una duplicación génica que pudo haber ocurrido en el linaje de los peces después de la divergencia entre peces y tetrápodos (Guilgur et al., 2006; Kah et al., 2007; Okubo y Nagahama, 2008), esta idea se basa en que los primitivos peces óseos como Sturgeon y Polypterus solo exhiben dos formas de GnRH por lo tanto, la duplicación de una isoforma ancestral de GnRH pudo dar lugar a las variantes GnRH-1 y GnRH-3, las cuales fueron

sujetas a especialización subsecuente de funciones y segregación neuroanatómica de células y proyecciones. A su vez otros estudios filogenéticos y evolutivos sugieren que la duplicación que dio lugar a GnRH1 y GnRH3 ocurrió antes de la divergencia de los peces y los tetrápodos y que los genes correspondientes se han perdido como ocurre con el 50-80% de los genes duplicados en los vertebrados terrestres o los restos de estos genes aún no han sido encontrados (Guilgur et al., 2006; Okubo y Nagahama, 2008; Lynch y Force, 2000). Guilgur et al., en el 2006, realizaron un extenso análisis filogenético (software PHYLIP) basado en el alineamiento de Clustal W de 84 prepro-GnRHs de gnathostomas. Este análisis evolutivo muestra únicamente dos principales linajes de GnRH parálogos: la GnRH de cerebro medio y la GnRH de la porción ventral del cerebro anterior (telencéfalo, región olfatoria, hipotálamo y nervio terminal). Estas formas corresponden a los grupos definidos por White et al. en 1998, sin embargo a pesar de estas observaciones resulta necesario un análisis filogenético más profundo para establecer el tiempo de origen de los genes específicos de la GnRH exclusiva de peces y saber si esta ocurrió antes o después de la divergencia de los peces y los tetrápodos (Guilgur et al., 2006).

Análisis estructurales de los genes que codifican las GnRHs apoyan esta clasificación general de las GnRHs en tres sistemas, esta conclusión además es confirmada por un extenso análisis filogenético (Millar, 2004).

Los genes de GnRH de vertebrados tienen una estructura común, iniciando por la presencia de 4 axones y 3 intrones. El análisis de las secuencias de los diferentes genes de GnRH mostró que las regiones codificantes son altamente conservadas. Sin embargo las regiones río arriba y río abajo son distintivamente divergentes (Alestrom et al., 1992; Chow et al., 1998).

Todos los decapeptidos de GnRH de vertebrados hasta ahora conocidos se originan de un mRNA llamado prepro-GnRH que comprende una estructura común: un péptido señal (permite a la proteína ser transferida al retículo endoplásmico) de 20-25 residuos de aminoácidos, el péptido de GnRH de 10 residuos, un conservado tripéptido de procesamiento (G-K-R) y un péptido asociado a GnRH o GAP de 40 a 50 residuos de longitud, esta estructura fue originalmente descrita en mGnRH (Adelman et al., 1986) y posteriormente confirmada en muchas otras especies de vertebrados.

El péptido señal, el tripéptido de procesamiento y la región N-terminal del GAP son codificadas en el exón 2, el core y la parte C-terminal del GAP son codificadas en el exón 3 y 4, las regiones 5' y 3' UTR son codificadas en los exones 1 y 4 respectivamente (Alestrom et al., 1992; Chow et al., 1998). El péptido señal es retirado por una peptidasa y el péptido de GnRH es transportado al aparato de Golgi donde convertidas prohormona y exopeptidasas liberan el péptido activo. La glicina del dominio C-terminal es amidada y el glutamato en el N-terminal es convertido en piroglutamato por una glutamina ciclotransferasa. El péptido maduro es concentrado en gránulos de secreción y es transportado a las terminales axónicas donde es liberado (Andersen et al., 1988; Rangaraju et al., 1991). La comparación de diferentes secuencias de prepro-GnRH, muestran que el GAP representa la región más divergente dentro y entre las especies (Zohar et al., 2009).

### 3.3 Modelo de estudio

*Chirostoma humboldtianum* (Fig. 4) pertenece a la familia Atherinopsidae, que se distribuye en el altiplano y la vertiente centrooccidental del país, e incluye a los peces blancos mexicanos y a los charales. Estos organismos tienen gran importancia económica y cultural debido a que han sido ampliamente utilizados para la alimentación humana desde tiempos prehispánicos. (Rojas y Sasso, 2005). Los peces resultan modelos ideales para el estudio del sistema neuroendocrino reproductivo debido a la ausencia del sistema porta-hipofiseal. En estos organismos la hipófisis consiste en adenohipófisis y neurohipofisis. La neurohipófisis principalmente consiste en grupos de fibras neurosecretoras que se originan en diferentes partes del cerebro y que secretan varios péptidos en la vecindad de las células hipofisiarias. La adenohipófisis en cambio contiene diferentes grupos de células que se asocian formando masas especializadas. Las neurohormonas que controlan la actividad de los diferentes tipos celulares son liberadas directamente por terminales nerviosas en la proximidad de sus células blanco, en algunas especies se observa incluso una sinapsis verdadera (Norris, 1996).



Figura 4: Ejemplar adulto de *Chirostoma humboldtianum*.

## 4.- JUSTIFICACIÓN

GnRH y su receptor son las principales moléculas que controlan la función de la ruta HPG, el conocimiento sobre el funcionamiento de esta ruta reproductiva es especialmente importantes en acuicultura debido a que permite desarrollar diversas estrategias para controlar la secreción hormonal de la hipófisis anterior, facilitando la reproducción de peces (Sivan, 2010; Zohar y Mylonas, 2001). Los peces teleósteos, entre los cuales se encuentra *Chirostoma humboldtianum* (familia Atherinidae) juegan un papel importante en la alimentación de los mexicanos desde tiempos prehispánicos, siendo comercializados en toda la república, sin embargo la producción del charal ha venido disminuyendo en años recientes, de tal manera que resulta de gran importancia el conocimiento sobre el proceso reproductivo de este organismo, en particular de la especie *humboldtianum* por ser el charal más grande, aunado al hecho de que los peces han resultado ser un modelo atractivo para el estudio de los mecanismos evolutivos y la diversificación de las funciones de GnRH y sus receptores en vertebrados (Kah et al., 2007), debido a que exhiben un alto número de variantes y a la característica anatómica de que en estos organismos no existe el sistema porta hipofisiario (Sivan, 2010). Este estudio tiene como objetivo determinar el número y tipo de receptores a GnRH presentes en el cerebro de *Ch. humboldtianum* a fin de sentar las bases sobre el conocimiento de la fisiología reproductiva de este organismo.

## 5.- OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL:

Realizar el aislamiento, secuenciación y clonación de receptores a la hormona liberadora de gonadotropinas presentes en encéfalo anterior, encéfalo completo y gónadas de *Chirostoma humboldtianum*.

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES:

- A) Aislar los GnRH-Rs presentes en encéfalo anterior, encéfalo completo y gónadas de *Ch. humboldtianum*.
- B) Secuenciar los receptores a GnRHs de *Ch. humboldtianum*.
- C) Clonación de los GnRH-Rs de *Ch. humboldtianum*.
- D) Establecer la relación filogenética de los GnRH-Rs de *Ch. humboldtianum* con otras especies de teleósteos.

## 6.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Fase de campo

#### Obtención de material biológico

Los ejemplares de *Chirotoma humboldtianum*, fueron colectados en la laguna de Zacápu, Michoacán. Se obtuvieron organismos maduros de entre 11.5 y 16 cm de longitud patrón, con un peso de entre 13 y 23 g. La colecta se realizó con el apoyo de los pescadores de la cooperativa local usando un chinchorro de 40 m de longitud y una apertura de malla de 1.25 cm, durante los meses de enero (recrudescencia tardía), febrero, marzo (madurez) y agosto (regresión) correspondientes a las diferentes etapas del ciclo reproductivo de este organismo.

Los peces fueron sexados y se anestesiaron con MS-222 Sigma®. Posteriormente se sacrificaron por decapitación y se extrajeron muestras de encéfalo completo o, encéfalo anterior y gónadas, que fueron depositadas por separado en tubos de microcentrífuga con capacidad de 1.5 ml, previamente tratados con dietilpirocarbonato (DEPC) en dilución 1:1000. Las muestras fueron mantenidas en 500 µl de RNAlater® previo a la extracción de RNA.



## 6.2 Fase de laboratorio.

### 6.2.1 Extracción de RNA total

Las muestras fueron removidas de RNAlater y en tubos limpios se les adicionó TRIzol® Reagente (GIBCO) para la extracción del RNA total por el método del ácido guanidínico tiocianato-fenol-cloroformo desarrollado por Chomczynski y Sacchi en 1987. La integridad del RNA total aislado se verificó mediante la presencia de las bandas de RNA ribosomal de 28S y 18S a través de geles desnaturalizantes de agarosa con formaldehído, teñidos con bromuro de etidio.

### 6.2.2 Obtención de cDNA

La síntesis del cDNA se realizó a partir de las muestras de RNA total mediante el procedimiento de RT-PCR y siguiendo las especificaciones del kit Superscrip® III Reverse Transcriptase, oligo (dT)<sub>20</sub>, dicho kit incluye un tratamiento final con RNasa H.

### 6.2.3 Clonación de GnRH-Rs

#### 6.2.3.1 Diseño de oligos.

La clonación de los receptores de interés se realizó mediante el uso de oligonucleótidos específicos y degenerados diseñados a partir de la comparación de secuencias correspondientes a GnRH-Rs de organismos filogenéticamente cercanos a nuestro modelo de estudio (teleósteos) previamente reportadas en el GenBank. En las tablas 1 y 2 se

enlistan los nombres de los organismos y el número de GenBank de las secuencias consideradas en el diseño de los oligos correspondientes a cada uno de los dos receptores.

Tabla 1: Secuencias empleadas en el diseño de oligos para la clonación del GnRH-R1 de *Ch. humboldtianum*.

Nombre del organismo	Núm de acceso en el GenBank
<i>Astatotilapia burtoni</i>	AY028476.1
<i>Oreochromis aureus</i> / <i>Oreochromis niloticus</i>	AY381298.1
<i>Odontesthes bonariensis 1B</i>	DQ875596.1
<i>Oreochromis niloticus</i>	AB111357.2
<i>Epinephelus coioides</i>	DQ536435.1
<i>Oryzias latipes</i>	AB057676.1
<i>Tetraodontes nigroviridis</i>	AB212826.1

Tabla 2: Secuencias empleadas en el diseño de oligos para la clonación del GnRH-R2 de *Ch. humboldtianum*.

Nombre del organismo	Núm de acceso en el GenBank
<i>Odontesthes bonariensis 2A</i>	DQ875595.1
<i>Seriola</i>	AJ130876.1
<i>Morone Saxitalis</i>	AF218841.1
<i>Dicentrarchus labrax</i>	AJ419594.1
<i>Micropogonias undulatus</i>	DQ295885.1
<i>Astatotilapia burtoni</i>	AY705931.1
<i>Oreochromis aureus</i> / <i>Oreochromis niloticus</i>	AY381299.1
<i>Colisa lalia</i>	AB113211.1
<i>Oreochromis niloticus</i>	AB111356.2
<i>Oryzias latipes</i>	NM_001104882.1

### 6.2.3.2 Condiciones de PCR

#### Condiciones de PCR generales para ambos receptores

Los oligos descritos en la sección anterior se utilizaron en la amplificación del material mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La reacción se llevó a cabo en una mezcla conteniendo 5ng de la muestra de cDNA de *Ch. humboldtianum*, 1µl del oligo directo (Fw), 1µl del oligo Reverso (Rv) y 12.5µl de enzima Taq PCR Master mix® kit de QIAGEN, ajustado con agua inyectable a un volumen final de 25µl. Las condiciones de trabajo en el termociclador fueron, una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguida por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 min a la TM (temperatura media) indicada en cada set de oligos y 1 min a 72°C, con una elongación final de 7 min a 72°C. La temperatura de mantenimiento y almacenamiento de los productos de PCR fue de 4°C.

#### Condiciones de PCR para el GnRH-R1

En la secuenciación del GnRH-R1 fueron empleados 3 distintos oligos, en la tabla 3 aparecen los detalles respecto a la secuencia y dirección de estos. Nótese que únicamente se utilizó un primers Rv, el cuál fue emparejado con cada uno de los dos Fw, obteniéndose así los dos distintos sets de oligos con los que se trabajó (CD1/AB7 y AB6/AB7).

Tabla 3: Oligos empleados en la secuenciación del Receptor 1

Nombre del oligo	Dirección del oligo	Secuencia del oligo
CD1	5'→3' (Fw)	5'- <u>Y</u> GC CTG CAG TAA <u>Y</u> CT <u>Y</u> GC CC -3'
AB6	5'→3' (Fw)	5'- TAC CTG CTG GGG AT <u>Y</u> <u>TKK</u> <u>TMC</u> TG -3'
AB7	3'←5' (Rv)	5'- CAG GTG TTC AGG TTC <u>CCR</u> <u>AAS</u> AC -3'

Las letras subrayadas indican degeneración en los oligos.

## Condiciones de PCR para el GnRH-R2

En la secuenciación del GnRH-R2 fueron empleados 4 distintos oligos; 2 Fws y 2 Rvs. En la tabla 4 aparecen los detalles respecto a la secuencia y dirección de estos oligos. Nótese que los 4 fueron combinados a modo de formar 3 diferentes sets de oligos KM6/KM7, pJ/Odo y pJ/KM7. Por la posición teórica de los oligos (fig. 9) con los dos primeros sets se debió obtener la secuencia completa que se reporta en este trabajo (425 pb), puesto que en teoría los oligos KM6 y Odo se superponen en la región de la TM6, sin embargo como a nivel experimental la secuenciación no inicia en la posición del oligo Fw sino más adelante, hizo falta trabajar con el tercer set de oligos (pJ/KM7) a fin de secuenciar esta región de la TM6.

Tabla 4: Oligos empleados en la secuenciación del Receptor 2

Nombre del oligo	Dirección del oligo	Secuencia del oligo
pJ	5'→3' (Fw)	5'- CAT TAC CCA TCC CGA GGA CTT -3'
KM6	5'→3' (Fw)	5'- GGA CTC CAT ACT ACC TGC TGG G -3'
Odo	3'←5' (Rv)	5'- AGG GAA GAA CCA ATA CCA CAG -3'
KM7	3'←5' (Rv)	5'- GTA GAT <u>KAK</u> <u>BGG</u> GTC CAG GCA GG -3'

Las letras subrayadas indican degeneración en los oligos.

### 6.2.4 Verificación de productos de PCR

Los productos obtenidos de las distintas reacciones de PCR, fueron verificados en geles de agarosa al 1%, dichos geles fueron teñidos con bromuro de etidio ( $C_{21}H_{20}N_3Br$ ) (BrEt), bromuro de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridinio, y revelados con luz UV (longitud de onda entre 400 nm y 15 nm).

### 6.2.5 Purificación de productos de PCR

Las bandas de los productos de PCR correspondientes al Peso Molecular (PM) esperado fueron obtenidas del gel mediante un corte rectangular alrededor de la banda y purificadas utilizando el QIAquick Gel Extraction Kit Protocol de QIAGEN. Las bandas purificadas se verificaron nuevamente en geles de agarosa al 1% teñidos con BrEt, para garantizar una adecuada concentración que permitiera la clonación y posterior secuenciación.

### 6.2.6. Clonación molecular de productos de PCR

Los productos de PCR fueron clonados siguiendo el protocolo pGEM®-T Easy Vector Systems, el cual consiste en 3 etapas a continuación descritas.

Ligación.

Los productos de PCR de interés fueron ligados en el plásmido pGEM®-T usando tubos para microcentrífuga de 0.5 ml de capacidad. Se hizo la siguiente mezcla: 5µl de buffer de ligación rápida 2x, 1 µl del plásmido, 1µ de la muestra de producto de PCR, 1µl de DNA ligasa T4 y 2µl de agua desionizada, finalmente la mezcla se incubó a 4°C toda la noche.

Transformación.

Se utilizaron células competentes JM109 transformadas mediante choque térmico e incubadas en medio SOC líquido a 37°C/1.5 h con agitación de 150 rpm, posteriormente 200µl de este medio con células transformantes fueron inoculados (técnica de sembrado masivo) en placas petri con medio LB previamente adicionado con 20µl de Xgal, 100µl de IPTG y 50 µg de ampicilina. Finalmente las placas fueron incubadas toda la noche a 37°C.

Para aumentar el número de colonias, se hizo una resiembra de células transformadas, seleccionando únicamente las colonias blancas de las placas de sembrado masivo (las colonias blancas son recombinantes al tener presente el inserto en el sitio poli-linker del plásmido, interrumpiendo así la expresión del gen de la galactosidasa y evitando la hidrólisis del X-gal, responsable de la coloración azul en la colonia) e inoculándolas a modo de estría en nuevas placas petri con medio LB/Xgal/IPTG/ampicilina. Las placas fueron incubadas a 37°C toda la noche para asegurar el color de la colonia, posteriormente las estrías fueron inoculadas en tubos de ensaye con medio de cultivo LB líquido y se incubaron toda la noche a 37°C / 150 rpm.

Purificación de plásmidos.

Los plásmidos fueron purificados a partir de las células transformadas siguiendo el protocolo Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System.

Se verificó la presencia del inserto en los plásmidos mediante PCR bajo las condiciones específicas para cada set de oligos partiendo del plásmido como secuencia molde, los productos de PCR fueron verificados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

#### 6.2.7 Secuenciación de productos de PCR

La secuenciación de los productos de PCR se llevó a cabo en el secuenciador automatizado de DNA, ABI Prism 3100 de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES Iztacala.

## 6.2.8 Análisis filogenético de las secuencias obtenidas

Preparación de las secuencias a analizar.

Para analizar las secuencias de los GnRH-Rs encontrados en *Ch. humboldtianum*, se generó una secuencia consenso única para cada receptor que contuviera los diferentes segmentos clonados de ese receptor. Las secuencias fueron analizadas en el secuenciador ABI Prism 3100 de la UBIPRO FES-Iztacala que secuenció cada segmento con ambos oligos (Fw y Rv), ambos resultados fueron sobrepuestos generando un consenso de ese segmento, posteriormente fueron sobrepuestos los diferentes segmentos correspondientes a un mismo subtipo de receptor. Las secuencias consenso fueron revisadas manualmente usando sus respectivos electroferogramas mediante el programa Bioedit.

Análisis de las secuencias mediante programas computacionales.

### BLAST

Las secuencias consenso obtenidas de los GnRH-Rs fueron analizadas con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para encontrar similitud con las secuencias ya existentes en el GenBank.

### CLUSTALW

Las secuencias reportadas en BLAST como altamente similares a la secuencia de *Ch. humboldtianum* se alinearon usando el programa ClustalW EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para encontrar posibles puntos mutacionales (transiciones, transversiones, deleciones, gaps). Los alineamientos fueron revisados

manualmente, posteriormente se hizo la traducción a proteínas determinando el marco de lectura correspondiente a cada secuencia (1, 2 ó 3).

#### PhYDE

El programa PhYDE fue utilizado a la par que el programa CLUSTALW para analizar tanto las secuencias nucleotídicas como las traducciones a proteínas y encontrar posibles puntos mutacionales (transiciones, transversiones, deleciones, gaps y sustitución de aminoácido).

#### GENEIOUS

La construcción del árbol filogenético por el método de neighbor-joining se realizó utilizando este programa, el cuál empleó las secuencias nucleotídicas encontradas experimentalmente de *Ch. humboldtianum* y las de otras especies para establecer la relación filogenética. La significancia estadística de este árbol filogenético fue analizada con el programa Mrbayes (3.1) utilizando el modelo evolutivo GTR en el cual se realizaron 1,100,000 repeticiones.



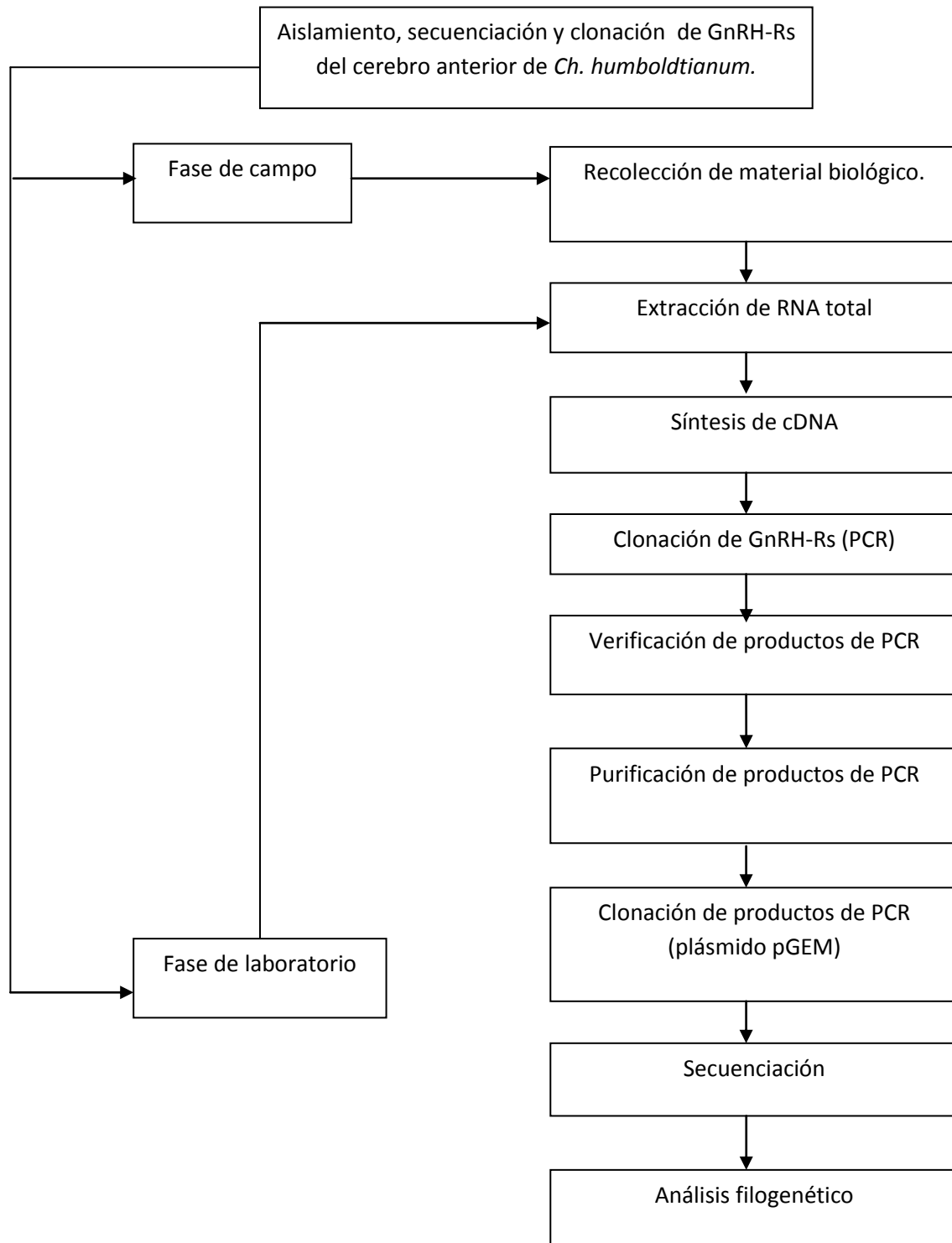


Figura 5: Estrategia experimental seguida en la secuenciación de GnRH-Rs de *Ch. humboldtianum*.

## 7.- RESULTADOS

### GnRH-R1

#### 7.1 Clonación molecular del GnRH-R1

La clonación del receptor 1 se realizó utilizando el oligo Rv y los dos Fw descritos en la sección de materiales y métodos, obteniendo dos secuencias, una de 99 pb y otra de 216 pb, donde la secuencia de menor tamaño se encuentra contenida en la de mayor tamaño. En la tabla 5 se describe el trabajo con los dos sets de oligos usados (AB6/AB7; CD1/AB7). La posición teórica de los tres oligos empleados en la secuenciación de este receptor se puede observar en la figura 6 sobre un modelo de GPCR. La secuencia de mayor tamaño obtenida con el set de oligos CD1/AB7 abarca experimentalmente desde el dominio intracelular 3 (ICL3) hasta el dominio transmembranal 7. La secuencia obtenida con el set de oligos AB6/AB7 se encuentra entre los dominios transmembranales 6 y 7.

La presencia del GnRH-R1 fue encontrada en muestras de encéfalos y gónadas procedentes de colectas de enero, febrero, marzo y agosto del 2011, esta información se encuentra desglosada en la Tabla 6.

Tabla 5: Condiciones de trabajo para la clonación del Receptor 1

Set de oligos	Temperatura media de PCR	Número de nucleótidos obtenidos
AB6 / AB7	TM= 59°C	99 pb
CD1 / AB7	TM= 62°C	216 pb

Tabla 6: Presencia de GnRH-R1 en diferentes órganos y meses

Mes de colecta (2011)	Sexo del organismo	Tipo de muestra
Enero	Hembra y Macho	Encéfalo anterior Encéfalo completo
Febrero	Macho	Encéfalo anterior
Marzo	Hembra	Encéfalo anterior Encéfalo completo Ovario
Agosto	Macho	Encéfalo completo Testículo

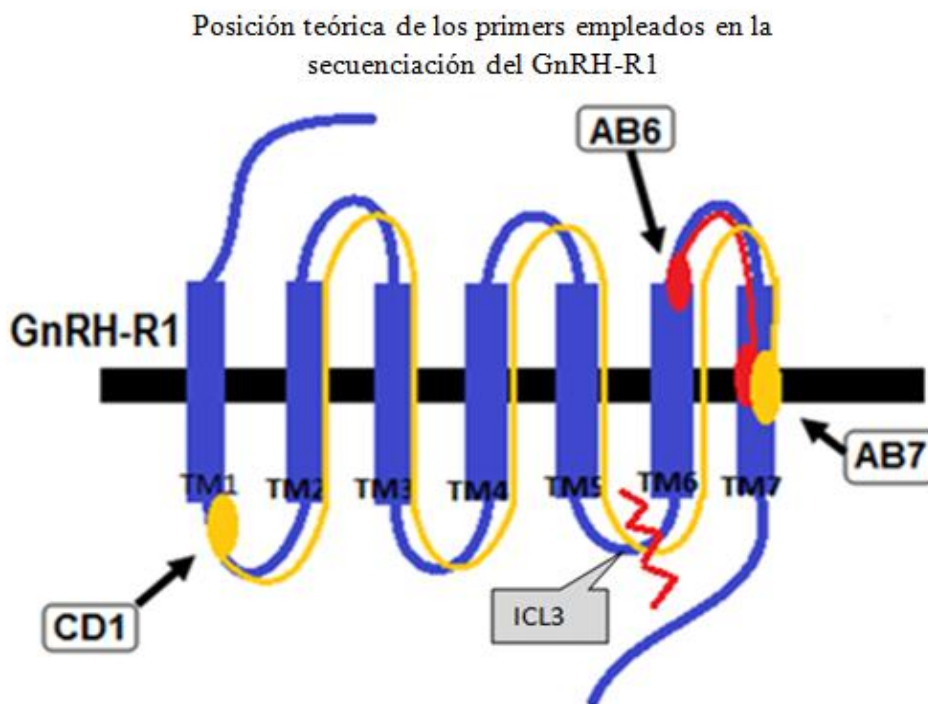


Figura 6: Posición teórica de los tres oligos (AB6, AB7 y CD1) usados en la secuenciación del GnRH-R1 en *Ch. humboldtianum*. En rojo aparece la posición del set de oligos AB6/AB7 empleados en la secuenciación del segmento de 99 pb. En amarillo aparece el set de oligos CD1/AB7 usados en la secuenciación del segmento de 216 pb. La línea roja en zig-zag en la ICL3 indica la región donde inicia la secuencia obtenida experimentalmente con el primer CD1.

Las dos secuencias arriba referidas correspondientes a la clonación del GnRH-R1 se observan en los geles de la figura 7(A) y 7(B), donde el gel A contiene la secuencia de 99 pb obtenida del trabajo con el set de oligos AB6/AB7. El gel B contiene la secuencia de 216 pb obtenida con los oligos CD1/AB7. En el gel C se observa el mismo segmento de 216 pb en muestras de diferentes colectas.

La secuencia consenso obtenida de este receptor se observa en la figura 8, donde también es mostrada su correspondiente traducción a aminoácidos.

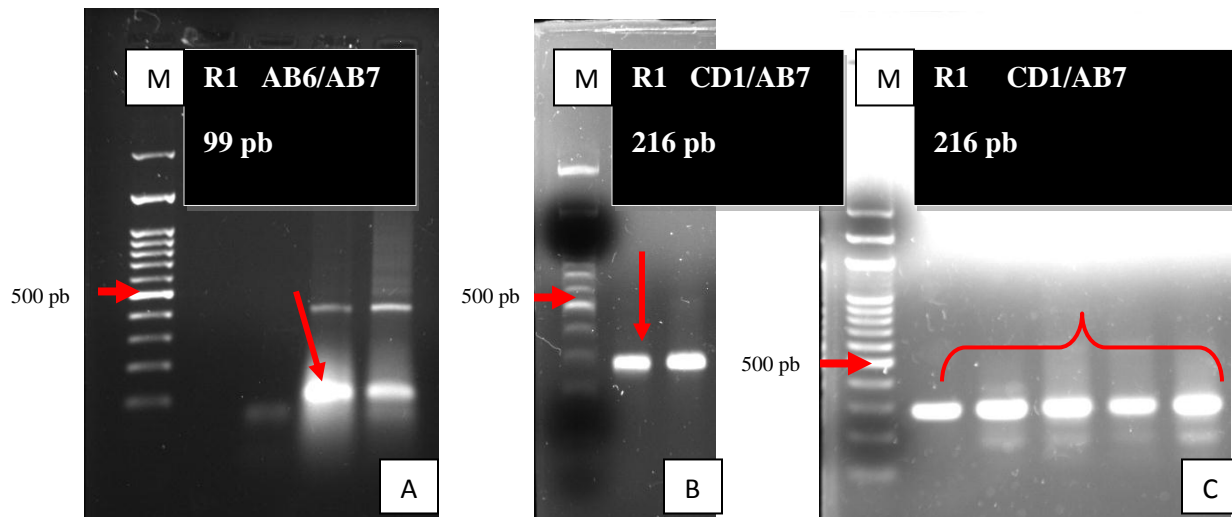


Figura 7. Geles mostrando los diferentes segmentos del R1 a GnRH secuenciadas a partir de *Ch. humboldtianum*. En el gel A se puede observar la banda de 99 pb obtenida con el set de oligos AB6/AB7 a partir de una muestra de cDNA de encéfalo anterior/enero 2011. En el gel B se observa la banda de 216 pb obtenida con el set de oligos CD1/AB7 a partir de una muestra de cDNA de encéfalo completo/enero 2011. En el gel C se observan las bandas de 216 pb obtenidas con el set de oligos CD1/AB7 en diferentes órganos y meses, en los carriles 2, 3 y 4 observamos muestras de encéfalo anterior, ovario y encéfalo completo de marzo respectivamente, en el carril 5 y 6 se observan muestras de encéfalo completo y testículo de agosto respectivamente. Como se puede observar por la presencia de las bandas y la intensidad en todas estas muestras se encuentra presente el R1. La letra M de la esquina superior izquierda etiqueta al MPM que fue cargado en ese carril.

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del GnRH-R1										
GAG	TCC	CAG	CTG	CGC	CGC	AGC	GGC	ACT	GAC	GTG
E	S	Q	L	R	R	S	G	T	D	V
ATC	CCG	AAG	GCG	CGT	CTG	AAG	ACG	CTG	AGG	ATG
I	P	K	A	R	L	K	T	L	R	M
TCG	GTG	GTC	ATC	GTG	CTG	TCC	TTC	GTG	GTG	TGC
S	V	V	I	V	L	S	F	V	V	C
TGG	ACG	CCG	TAC	TAC	CTG	CTG	GGG	CTG	TGG	TAC
W	T	P	Y	Y	L	L	G	L	W	Y
TGG	TTC	CAG	CCC	GCC	ATG	CTG	CGC	CGC	ACG	CCG
W	F	Q	P	A	L	M	R	R	T	P
GAA	TAC	GTG	CAC	CAC	GCC	CTC	TTC	GTG	TTC	GGG
E	Y	V	H	H	A	L	F	V	F	F
AAC	CTG	AAC	ACC	TAA						
G	N	L	N	T						

Figura 8. Secuencia del GnRH-R1 de *Ch. humboldtianum* obtenida del consenso de los dos segmentos (99 y 216 pb) encontrados experimentalmente para este receptor. La traducción de la secuencia nucleotídica mostrada fue obtenida por medio del programa blastx (Frame +3). La tabla muestra una secuencia de 213 nucleótidos y 71 aminoácidos.

## GnRH-R2

### 7.2 Clonación molecular del GnRH-R2

La clonación del receptor 2 se realizó utilizando los dos oligos Rv y Fw descritos en la sección de materiales y métodos, obteniendo tres secuencias, una de 70 pb, otra de 336 pb y una de 425 pb, donde las secuencias de menor tamaño se encuentran contenidas en la de mayor tamaño. En la tabla 7 se describe el trabajo con los tres sets de oligos usados (KM6/KM7; pJ/Odo y pJ/KM7). La posición teórica de los cuatro oligos empleados en la secuenciación de este receptor se puede observar en la figura 9 sobre un modelo de GPCR. La secuencia de 70 pb abarca de la TM6 a la TM7, la secuencia de 336 pb se encuentra entre los dominios transmembranales 4 y 6. La secuencia de mayor tamaño (425 pb) y que contiene a las dos anteriores se encuentra entre los dominios transmembranales 4 y 7.

La presencia del GnRH-R2 fue encontrada únicamente en muestras de encéfalos procedentes de colectas de enero y febrero. Se muestrearon también los meses de marzo y agosto, sin embargo en estos últimos dos meses no se encontró la presencia de este receptor (Tabla 8).

Tabla 7: Condiciones de trabajo en la clonación del Receptor 2

Set de oligos	Temperatura media de PCR	Número de nucleótidos obtenidos
KM6 / KM7	TM= 62°C	70 pb
pJ/ Odo	TM= 60°C	336 pb
pJ / KM7	TM= 62°C	425 pb

Tabla 8: Presencia de GnRH-R2 en diferentes órganos y meses

Mes de colecta (2011)	Sexo del organismo	Tipo de muestra
Enero	Hembra	Encéfalo anterior
Febrero	Macho	Encéfalo anterior
Marzo	Hembra y Macho	Encéfalo anterior Encéfalo completo Ovario Testículo
Agosto	Macho	Encéfalo anterior Testículo

Los meses de marzo y agosto fueron muestreados sin embargo no se encontró la presencia del GnRH-R2.

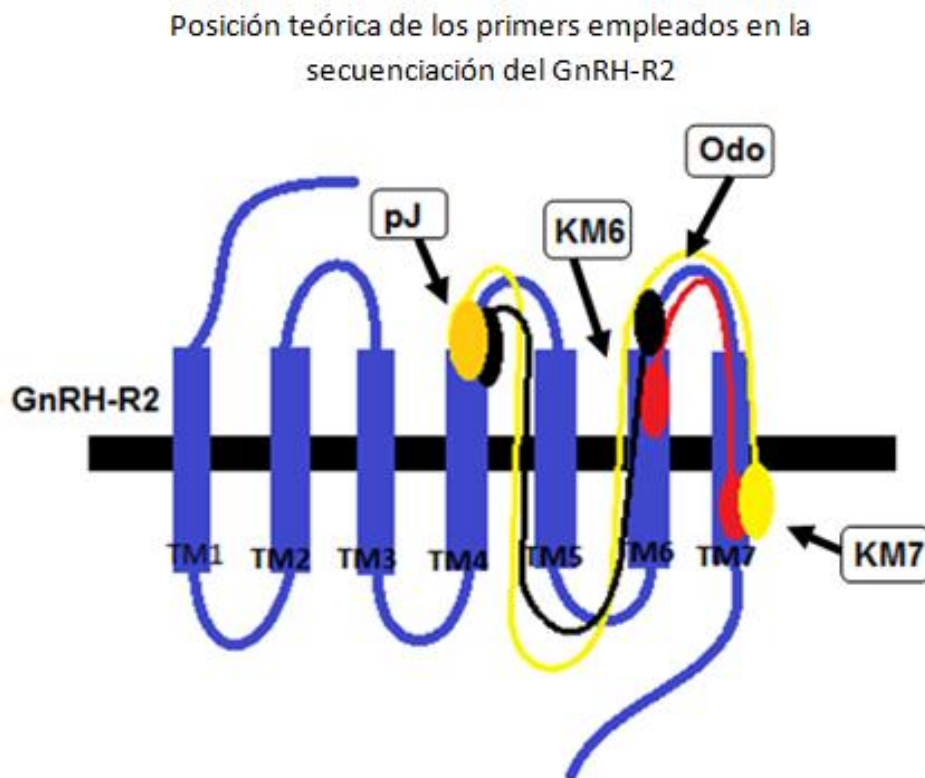


Figura 9: Posición teórica de los 4 oligos (pJ, Odo, KM6 y KM7) usados en la secuenciación del GnRH-R2 de *Ch. humboldtianum*. En rojo aparece la posición del set de oligos KM6/KM7 empleados en la secuenciación del segmento de 70 pb. En negro aparece la posición teórica del set de oligos pJ/Odo usados en la secuenciación del segmento de 336 pb. En amarillo aparece la posición del set de oligos pJ/KM7 usados en la secuenciación del segmento de 425 pb.

Las tres secuencias arriba referidas correspondientes a la clonación del GnRH-R2 se observan en los geles de la figura 10 (A, B y C), donde el gel A contiene la secuencia de 70 pb obtenida del trabajo con el set de oligos KM6/KM7, el gel B contiene la secuencia de 336 pb obtenida con los oligos pJ/Odo, el gel C contiene la secuencia de 425 pb obtenida con los oligos pJ/KM7. En la figura 11 se observa el gel con el muestreo que se hizo de los meses de marzo y agosto, donde no se pudo encontrar la presencia del GnRH-R2.

La secuencia consenso obtenida de este receptor 2 se observa en la figura 12, donde también es mostrada su correspondiente traducción a aminoácidos.



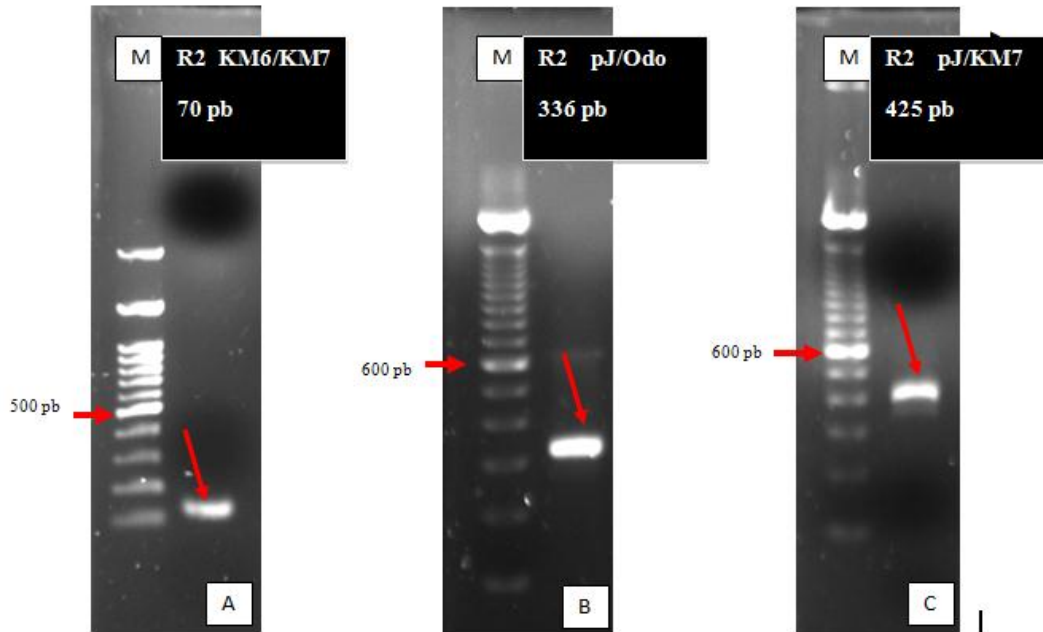


Figura 10: En los gels se muestran los tres diferentes segmentos obtenidos del GnRH-R2 encontrados en *Ch. humboldtianum*. En el gel A se observa la banda de 70 pb obtenida con el set de oligos KM6/KM7 a partir de una muestra de cDNA de encéfalo anterior/ enero 2011. En el gel B se observa la banda de 336 pb obtenida con el set de oligos pJ/Odo en una muestra de encéfalo anterior / enero 2011. En el gel C se observa la banda de 425 pb obtenida con el set de oligos pJ/KM7 en una muestra de encéfalo anterior/ febrero 2011. La letra M en la esquina superior izquierda hace referencia al MPM que fue cargado en el carril 1.

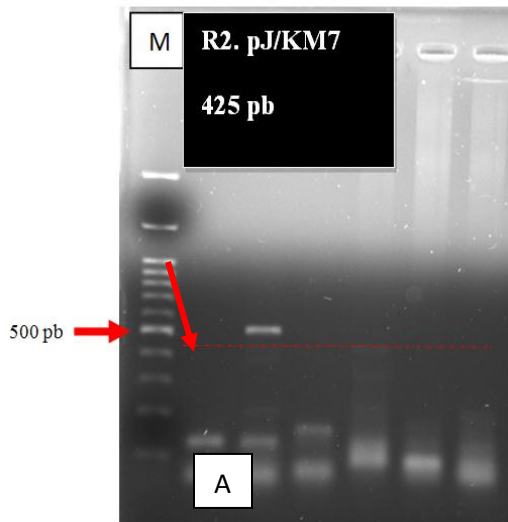


Figura 11: En el gel se observan resultados del trabajo con el set de oligos pJ/KM7, donde podemos observar en los carriles 2 y 3 muestras de encéfalo anterior y ovário de marzo respectivamente, en los carriles 4 y 5 observamos muestras de encéfalo completo y testículo de marzo respectivamente y en los carriles 6 y 7 observamos muestras de encéfalo anterior y testículo de agosto respectivamente. La línea roja marca el tamaño de producto esperado, al no encontrar este tamaño de banda se infiere que este GnRH-R2 no se encuentra presente en estas muestras. La letra M en la esquina superior izquierda hace referencia al MPM cargado en el carril 1.

Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del GnRH-R2													
ATT	ACC	CAT	CCC	GAG	GAC	TTC	ACC	CAG	TGC	ACA	ACT	CGT	GGG
I	T	H	P	E	D	F	T	Q	C	T	T	R	G
AGT	TTC	GTC	CCT	CGC	TGG	CAT	GAG	ACG	GCA	TAC	AAC	ATG	TTC
S	F	V	P	R	W	H	E	T	A	Y	N	M	F
ACT	TTT	TCA	TGT	CTG	TTC	TTG	TTG	CCA	CTG	ATC	ATC	ATG	ATC
T	F	S	C	L	F	L	L	P	L	I	I	M	I
ACC	TGT	TAC	ACC	AGG	ATC	TTC	TGT	GAG	ATC	TCC	AGA	CGG	CTG
T	C	Y	T	R	I	F	C	E	I	S	R	R	L
CAA	AAA	GAC	AAC	TTG	CCC	TCA	AAA	GAA	GTG	TAT	TTG	CGG	TGT
Q	K	D	N	L	P	S	K	E	V	Y	L	R	C
TCC	AAG	AAC	AAC	ATC	CCC	AAA	GCG	CGG	ATG	AGA	ACT	CTG	AAA
S	K	N	N	I	P	K	A	R	M	R	T	L	K
ATG	AGT	ATT	GTA	ATC	GTC	TTG	TCC	TTC	ATT	ATC	TGT	TGG	ACT
M	S	I	V	I	V	L	S	F	I	I	C	W	T
CCA	TAC	TAC	CTG	CTT	GGC	CTG	TGG	TAT	TGG	TTT	TTC	CCC	GAT
P	Y	Y	L	L	G	L	W	Y	W	F	F	P	D
GAC	CTG	GAG	GGA	AAG	GTG	TCA	CAG	TCA	CTG	ACC	CAC	ATC	CTG
D	L	E	G	K	V	S	Q	S	L	T	H	I	L
TTC	ATC	TTT	GGG	CTA	TTC	AAC	GCC	TGC	CTG	GAC	CCA	ATA	ATC
F	I	F	G	L	F	N	A	C	L	D	P	I	I
TAC													
Y													

Figura 12. Secuencia del GnRH-R2 de *Ch. humboldtianum* obtenida del consenso de los tres segmentos (70, 336 y 425 pb) encontrados experimentalmente para este receptor. La traducción de la secuencia nucleotídica mostrada fue obtenida por medio del programa blastx (Frame +2). La tabla muestra una secuencia de 423 nucleótidos y 141 aminoácidos.

## 8.- DISCUSION

En el presente trabajo se lograron aislar, clonar y secuenciar por primera vez, dos subtipos del receptor a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH-R) del pez mexicano *Chirostoma humboldtianum*.

La región clonada de estos receptores resulta de gran importancia debido a que el asa ICL3 participa en el acoplamiento de las proteínas G, las asas extracelulares participan en el reconocimiento del ligando y las secuencias en los dominios transmembranales 6 y 7 son empleadas en la clasificación de estos receptores.

Los árboles filogenéticos (Fig. 15 y 18) presentados en este estudio establecen las relaciones evolutivas de los GnRH-Rs de *Ch. humboldtianum* con otros teleósteos, en ambos receptores se encontró la mayor similitud con *Odontesthes bonariensis*, un organismo perteneciente a la familia de Atherinidos al igual que nuestro modelo de estudio. Para estos receptores también se establece una relación evolutiva cercana con representantes de la familia de los ciprínidos y los cíclidos. Los porcentajes de similitud entre estos receptores pueden variar al contar con la secuencia completa. En los árboles filogenéticos se muestra que el GnRH-R2 tiene una secuencia muy parecida al receptor que en *Odontesthes* cumple la función hipofisiotrópica además que este receptor no fue encontrado en muestras de gónadas a diferencia del receptor 1 que si fue encontrado en estos tejidos, sugiriendo una función autocrina/parácrina para este último.

## GnRH-R1

Las secuencia obtenida para el GnRH-R1 correspondiente a *Ch. humboldtianum* con una longitud de 216 pb, fue analizada con el programa Blast, obteniendo los porcentajes de similitud con otros teleósteos mostrados en la tabla 9.

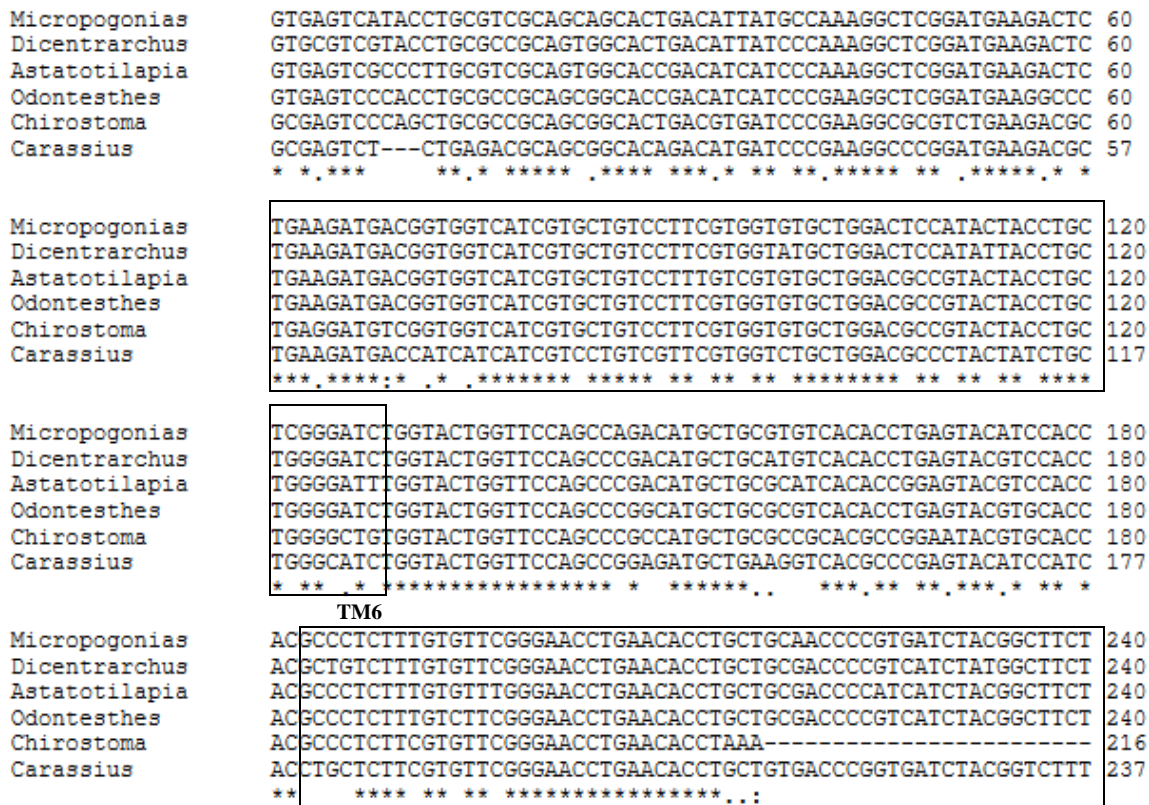
El alineamiento de las secuencias nucleotídicas reportadas con altos porcentajes de similitud con la secuencia de *Ch. humboldtianum* se muestra en la figura 13, donde también es reportada la posición de los dominios transmembranales 6 y 7. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de estos mismos organismos altamente similares se muestra en la figura 14, encerrados en recuadros rojos se encuentran los aminoácidos que representan puntos mutacionales en la secuencia de *Chirostoma*. Esta secuencia parcial de RI fue analizada con el programa Blast encontrando que posee un porcentaje de similitud del 82% al 90% con otras especies de teleósteos como *Carassius*, *Odontesthes*, *Micropogonias*, *Dicentrarchus* y *Astatotilapia* (Tabla 9), al hacer el alineamiento de las secuencias de nucleótidos (Fig. 13) y de las secuencias de aminoácidos (Fig. 14) se puede observar que la secuencia de GnRH-R1 de *Ch. humboldtianum* se encuentra altamente conservada al presentar poca variación respecto a las secuencias correspondientes a este receptor previamente reportadas en el GenBank, sin embargo la comparación de las secuencias de aminoácidos nos permite analizar seis puntos mutacionales presentes en la secuencia de *Chirostoma* donde podemos observar tres cambios de aminoácidos en el ICL3 (Q, V y L). La secuencia reportada en este trabajo presenta una **Q** (polar sin carga) en lugar de **Y** (apolar), **P** (apolar) ó **H** (polar con carga), una **V** (apolar) en lugar de **I** (apolar) ó **M** (polar sin carga) y una **L** (apolar) en lugar de **M** (polar sin carga). En el dominio transmembranal 6 encontramos otros dos puntos mutacionales donde *Chirostoma* presenta **R** (polar con

carga) en lugar de **K** (polar con carga) y una **S** (polar sin carga) en lugar de una **T** (polar sin carga). Finalmente en el ECL3 encontramos que *Chirostoma* presenta una **A** (polar) en lugar de **D** (polar con carga), **G** (polar sin carga) ó **E** (polar con carga). Como podemos observar en las asas existe mayor variación de aminoácidos dado que son regiones menos conservadas en comparación con los dominios transmembranales. Se considera que los cambios de aminoácidos en el ICL3, ECL3 y en la TM6 no afectan la estructura de la proteína puesto que se realizan entre moléculas con la misma naturaleza química.

El árbol mostrado en la figura 15 muestra la relación filogenética entre la secuencia del GnRH-R1 de *Ch. humboldtianum* y un grupo de teleósteos cercanamente relacionados.

Tabla 9: Porcentaje de homología entre la secuencia nucleotídica de GnRH-R1 de *Chirostoma humboldtianum* con otras especies de teleósteos.

Especie	Porcentaje de homología	Número de acceso al GenBank
Pejerrey <i>(Odontesthes bonariensis)</i>	90%	DQ875596.1
Haplochromis burtoni <i>(Astatotilapia burtoni)</i>	88%	AY028476.1
Atlantic croacker <i>(Micropogonias undulatus)</i>	86%	DQ355380.1
European seabass <i>(Dicentrarchus labrax)</i>	86%	AJ606685.2
Gold fish <i>(Carassius auratus)</i>	82%	AF121845.1



TM7

Figura 13: Alineamiento de la secuencia de 216 pb correspondiente al GnRH-R1 de *Ch. humboldtianum* con las secuencias de *Micropogonias undulatus*, *Dicentrarchus labrax*, *Astatotilapia burtoni*, *Odontesthes bonariensis* y *carassius auratus*. En recuadros se encuentran los dominios transmembranales 6 y 7.

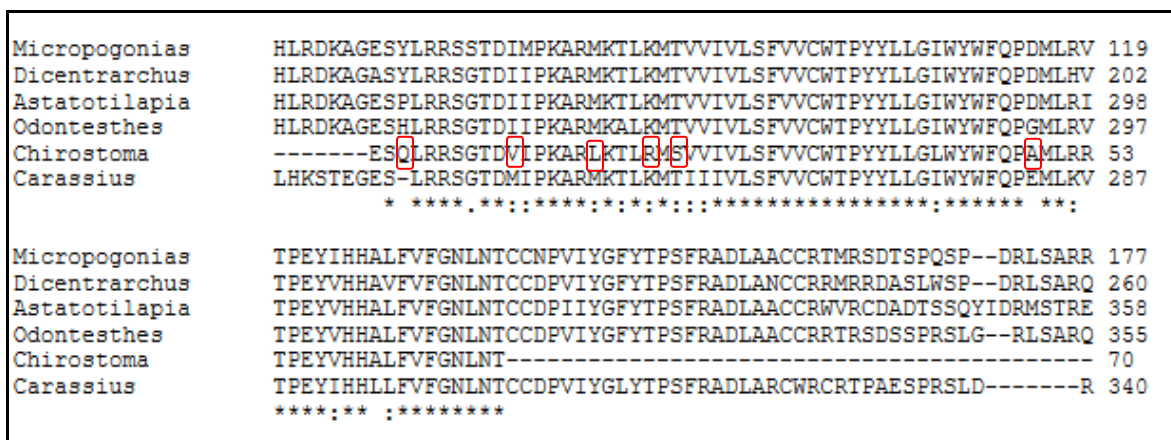


Figura 14: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del GnRH-R1 de *Ch. humboldtianum* con las secuencias de aminoácidos de *Micropogonias undulatus*, *Dicentrarchus labrax*, *Astatotilapia burtoni*, *Odontesthes bonariensis* y *carassius auratus*. En los recuadros rojos se encuentran los aminoácidos mutados.

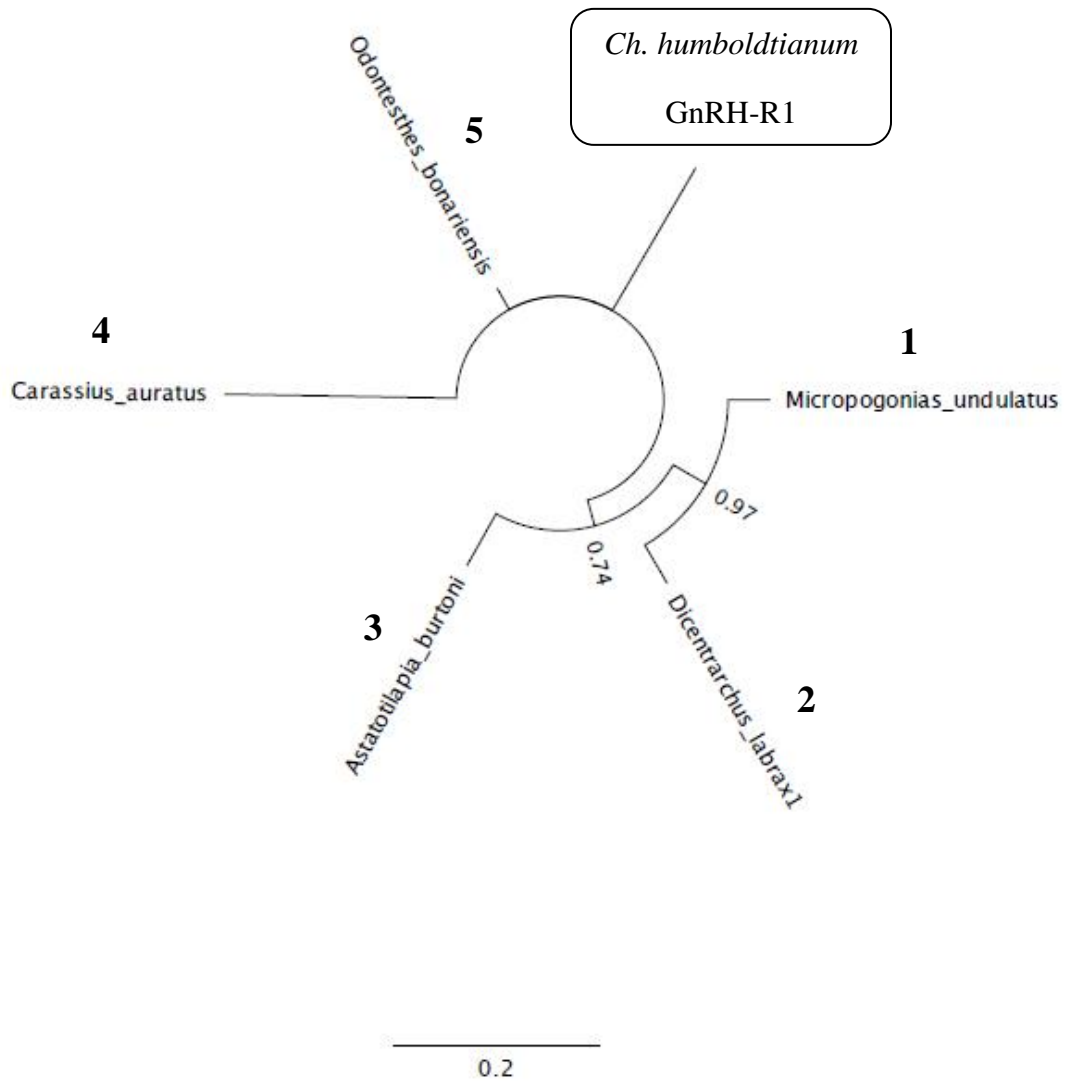


Figura 15. Árbol filogenético de GnRH-R1 en teleósteos, deducido de la secuencia de aminoácidos, usando el método del neighbor-joining mediante el programa Mrbayes (3.1). Los números indican la probabilidad posterior después de 1,100,000 réplicas. (1-*Micropogonias undulatus*, 2-*Dicentrarchus labrax*, 3-*Astatotilapia burtoni*, 4-*Carassius auratus*, 5-*Odontesthes bonariensis*).

## GnRH-R2

Las secuencia obtenida para el GnRH-R2 correspondiente a *Ch. humboldtianum* con una longitud de 425 pb, fue analizada con el programa Blast, obteniendo los porcentajes de similitud con otros teleósteos mostrados en la tabla 10.

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas reportadas con altos porcentajes de similitud con la secuencia de *Chirostoma* se muestra en la figura 16, donde también es reportada la posición de los dominios transmembranales 4, 5, 6 y 7. El alineamiento de las secuencias de aminoácidos de estos mismos organismos altamente similares se muestra en la figura 17, encerrados en recuadros rojos se encuentran los aminoácidos que representan puntos mutacionales en la secuencia de *Chirostoma*. El análisis de esta secuencia con el programa Blast nos dio un porcentaje de similitud de entre 83% y 92% con otras especies de teleósteos como *Fundulos*, *Pseudopleuronectes*, *Colisa*, *Seriola*, *Odontesthes*, *Astatotilapia*, *Oreochromis*, *Acanthopagrus*, *Sparus*, *Morone* y *Dicentrarchus* (Tabla 10). El alineamiento de las secuencias de nucleótidos (Fig. 16) y aminoácidos (Fig. 17) de estos organismos con alto porcentaje de similitud nos permite observar que el GnRH-R2 de *Ch. humboldtianum* se encuentra altamente conservado al no existir una gran variación entre las secuencias de estos organismos. En la comparación de las secuencias de aminoácidos se pueden observar dos puntos mutacionales presentes en el ICL3 de *Ch. humboldtianum* donde esta secuencia presenta en un punto una **Q** (polar sin carga) en lugar de **Y** (apolar), **K** (polar con carga) ó **R** (polar con carga) y en otro punto una **K** (polar con carga) en lugar de **N** (polar sin carga) ó **S** (polar sin carga). Ambas mutaciones se encuentran en el asa intracelular 3 sin embargo en la segunda mutación el aminoácido **K** tiene carga a diferencia



de los aminoácidos presentes en las otras secuencias, cabe mencionar que este segmento se encuentra dentro del citoplasma donde la presencia de cargas puede tener un efecto menos drástico que si se encontrara dentro de un segmento transmembranal. Se considera que estas mutaciones no afectan la vía de señalización del receptor.

El árbol mostrado en la figura 18 muestra la relación filogenética entre la secuencia del GnRH-R2 de *Ch. humboldtianum* y un grupo de teleósteos cercanamente relacionados.

Tabla 10: Porcentaje de homología entre la secuencia nucleotídica de GnRH-R2 de *Ch. humboldtianum* con otras especies de teleósteos.

Especie	Porcentaje de homología	Número de acceso al GenBank
Pejerrey ( <i>Odontesthes bonariensis</i> )	92%	DQ875595.1
Striped sea-bass ( <i>Morone saxatilis</i> )	88%	AF218841.1
( <i>Seriola dumerilii</i> )	88%	AJ130876.1
Black porgy ( <i>Acanthopagrus-schlegelii</i> )	86%	AY820276.1
European seabass ( <i>Dicentrarchus labrax</i> )	86%	AJ419594.1
Gilthead seabream ( <i>Sparus aurata</i> )	86%	AY587011.1
Haplochromis burtoni ( <i>Astatotilapia burtoni</i> )	85%	AY705931.1
Nile tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) Predicted	85%	XM 003437677.1
Winter flounder ( <i>Pseudopleuronectes americanus</i> )	85%	HQ623430.1
Nile tilapia ( <i>Oreochromis aureus</i> )	84%	AY381299.1
Dwarf gourami ( <i>Colisa lalia</i> )	83%	AB113211.1
Mummichog ( <i>Fundulus heteroclitus</i> )	83%	AB426466.1
Nile tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	83%	AB111356.2



OreochomisA	CCCGAGAGCCCGGATGAGAACT	CTGAAAAATGAGTATTGTGATTGTTCTGTCTTTTCATCAT	857
Predicted	CCCGAGAGCCCGGATGAGAACT	CTGAAAAATGAGTATTGTGATTGTTCTGTCTTTTCATCAT	899
OreochromisN	CCCGAGAGCCCGGATGAGAACT	CTGAAAAATGAGTATTGTGATTGTTCTGTCTTTTCATCAT	857
Astatotilapia	CCCGAGAGCCCGGATGAGAACT	CTGAAAAATGAGTATTGTGATTGTTCTGTCTTTTCATCAT	857
Chirostoma	CCCCAAAGCCCGGATGAGAACT	CTGAAAAATGAGTATTGTAATCGTCTTGTCTTTTCATCAT	285
Odontesthes	CCCCAAAGCCCGGATGAGAACT	CTAAAAATGAGTATTGTGATCGTGTGTCCTTTCATCAT	857
Acanthopagrus	CCCCCGAGCCCGGATGAGAACT	CTAAAAATGAGTATAGTGATCGTGTGTCCTTTCATCAT	857
Sparus	CCCCCGAGCCCGGATGAGAACT	CTAAAAATGAGTATAGTGATCGTGTGTCCTTTCATCAT	542
Dicentrarchus	CCCCAGAGCCCGGATGAGAACT	CTAAAAATGGGTATTGTGATTGTGTCCTTTCATCGT	857
Morone	CCCCAGAGCCCGGATGAGAACT	CTAAAAATGAGTATTGTGATCGTGTGTCCTTTCATCGT	857
Seriola	CCCCAGAGCCCGGATGAGAACT	CTAAAAATGAGTATTGTAATTGTCTTGTCTTTTATTAT	857
Pseudopleuronectes	CCCCAGAGCCCGAATGAGAACT	CTAAAAATGAGTATAGTTATTGTCTTGTCTTTTATTAT	824
Colisa	TCCCAGGGCCCGGATGAGAACT	CTGAAGATGAGCATTGTTATCGTATTGTCTTTTCATTGT	824
Fundulos	TCCCAGGGCCCGGATGAGAACA	TAAAAATGAGCGTTGTGATTGTCTGTCCTTTTCATCAT	839
	** ...** **.******:	* **.***.* **.*** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **	

OreochomisA	CTGCTGGACTCCATACTACCTGCTGGGCCTG	TGGTACTGGTTCTTCCCTGACGACCTGGA	917
Predicted	CTGCTGGACTCCATACTACCTGCTGGGCCTG	TGGTACTGGTTCTTCCCTGACGACCTGGA	959
OreochromisN	CTGCTGGACTCCATACTACCTGCTGGGCCTG	TGGTACTGGTTCTTCCCTGGCGACCTGGA	917
Astatotilapia	CTGCTGGACTCCATACTACCTGCTGGGCCTG	TGGTACTGGTTCTTCCCTGACGACCTGGA	917
Chirostoma	CTGTTGGACTCCATACTACCTGCTTGGCCTG	TGGTATTGGTTTTTCCCCGATGACCTGGA	345
Odontesthes	CTGCTGGACTCCATACTACCTGCTGGGCCTG	TGGTATTGGTTCTTCCCTGACGACCTGGA	917
Acanthopagrus	CTGCTGGACTCCATACTACCTGCTGGGCCTG	TGGTACTGGTTCTTCCCCGACGACCTGGA	917
Sparus	CTGCTGGACTCCATACTACCTGCTGGGCCTG	TGGTACTGGTTCTTCCCCGACGATCTGGA	602
Dicentrarchus	CTGCTGGACTCCATACTACCTGCTGGGCCTG	TGGTACTGGTTCTTCCCCGACGACCTGGA	917
Morone	CTGCTGGACTCCATACTACCTGCTGGGCCTG	TGGTACTGGTTCTTCCCCGACGACCTGGA	917
Seriola	CTGCTGGACTCCATACTACCTGCTGGGCCTG	TGGTACTGGTTCTTCCCCGACGACCTGGA	917
Pseudopleuronectes	CTGCTGGACTCCATACTACCTGCTGGGCCTG	TGGTACTGGTTCTTCCCTGATGACCTTGA	884
Colisa	CTGCTGGACTCCATACTACCTGCTGGGCCTG	TGGTACTGGTTCTTCCCTGACGATCTGGA	884
Fundulos	CTGCTGGACTCCATACTACCTGCTGGGCCTG	TGGTACTGGTTCTTCCCTGATGACCTGGA	899
	*** **.***.* **.******:** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **	***** **.*** ** ** **^ ** ** ** **	

TM6

(continua)





Chirostoma	-----ITHPEDFTQCTTRGSFVPRWHETAYNMFTFSCLFL	35
Odontesthes	VMLTVAWGMSVVSVPQIFLFHNVTIITHPEDFTQCTTRGSFVPHWHETAYNMFTFSCLFL	226
Acanthopagrus	VMLTVAWGMSVLLSVPQMF LFHNVTIVHPEDFTQCTTRGSFVRHWHETAYNMFTFSCLFL	226
Sparus	VMLTVAWGMSVLLSVPQMF LFHNVTIVHPEDFTQCTTRGSFVRHWHETAYNMFTFSCLFL	121
Dicentrarchus	VMLTVAWGMSVLLSVPQMF LFHNVTI IHPEDFTQCTTRGSFVTHWHETAYNMFTFSCLFL	226
Morone	VMLTVAWGMSVLLSVPQMF LFHNVTI IHPEDFTQCTTRGSFVTHWHETAYNMFTFSCLFL	226
Seriola	VMLSVAWGMSVLSVPQIFLFHNVTI IHPEDFTQCTTRGSFVTHWHETAYNMFTFSCLFL	226
Pseudopleuronectes	VMLSVAWMSAVLSVPQIFLFHNVTI IHPPEFTQCTTRGSFVSHWHETAYNMFTFSCLFL	215
Colisa	VMLAVAWGMSVMSVLPQMF LFHSVTI IHPPEFTQCTTRGSFVTHWHETAYNMFTFSCLFL	215
OreochromisA	IMLMVAWALS VVLSVPQMF LFHNVTI IHPEDFTQCTTRGSFVTHWHETAYNMFTFSCLFL	226
Astatotilapia	IMLMVAWVMS VVLSVPQMF LFHNVTI IHPEDFTQCTTRGSFVTHWHETAYNMFTFSCLFL	226
Predicted	IMLMVAWAMS VVLSVPQMF LFHNVTI IHPEDFTQCTTRGSFVTHWHETAYNMFTFSCLFL	240
OreochormisN	IMLMVAWAMS VVLSVPQMF LFHNVTI IHPEDFTRCTTRGSFVTHWQGGKNNMFTFSCLFL	226
Fundulos	IMLAVAWGMS VVLSVPQVFLFHNVTI IHPEDFTQCTTWGSFATRWHETAYNMFTFSCLFL	225
	* : ** ** : *** ** : . * : . ***** **	
Chirostoma	LPLVIMITCYTRIFCEISRRLLKDNLPSEVYLFCSKNNIPKARMRTLKMSIVIVLSFII	95
Odontesthes	LPLVIMITCYTRIFCEISKRLRKNLPSNEVLRCSKNNIPKARMRTLKMSIVIVLSFII	286
Acanthopagrus	LPLVIMITCYTRIFCEISKRLRKNLPSNEVHLRRSKNNIPARMRTLKMSIVIVLSFII	286
Sparus	LPLVIMITCYTRIFCEISKRLRKNLPSNEVHLRRSKNNIPARMRTLKMSIVIVLSFII	181
Dicentrarchus	LPLVIMITCYTRIFCEISKRMKKNLPSNEVHLRRSKNNIPARMRTLKMGIVIVLSFIV	286
Morone	LPLVIMITCYTRIFCEISKRLRKNLPSNEVHLRRSKNNIPARMRTLKMSIVIVLSFII	286
Seriola	LPLVIMITCYTRIFCEISKRLRKNLPSNEVHLRCSKNNIPARMRTLKMSIVIVLSFII	286
Pseudopleuronectes	LPLVIMITCYTRILCEISKRLYDNLSSNEVLRCSKNNIPARMRTLKMSIVIVLSFII	275
Colisa	LPLVIMITCYTRIFCEISKRLRKNLPSSEVHLRCSKNNIPARMRTLKMSIVIVLSFIV	275
OreochromisA	VPLVIMITCYTRIFCEISKRLRKNLPSSEMHLRCSKNNIPARMRTLKMSIVIVLSFII	286
Astatotilapia	LPLVIMITCYTRIFCEISRRLKKNLPSSEMHLRCSKNNIPARMRTLKMSIVIVLSFII	286
Predicted	LPLVIMITCYTRIFCEISRRLKKNLPSSEMHLRCSKNNIPARMRTLKMSIVIVLSFII	300
OreochormisN	LPLVIMITCYTRIFCEISRRLKKNLPSSEMHLRCSKNNIPARMRTLKMSIVIVLSFII	286
Fundulos	LPLVIMITCYARIFHEISKRLKKNLD-----LRCSKNNIPKARMRTLKMSVIVLSFII	280
	: ** : ***** ** : . * : . * ** * ***** : ***** . : ** * ** :	
Chirostoma	CWTPYYLLGLWYFFFDDLEGKVSQSLTHILFIFGLFNACLDPIIY-----	141
Odontesthes	CWTPYYLLGLWYFFFDDLEGKVSHSLTHILFIFGLFNACLDPIIYGLFTIHFRTGLRQRY	346
Acanthopagrus	CWTPYYLLGLWYFFFDDLEGKVSHSLTHILFIFGLVNACLDPVIYGLFTIHFRTGLRRY	346
Sparus	CWTPYYLLGLWYFFFDDLEGKVSHSLTHILFIFGLVNACLDPVIYGLFTIHFRTGLRRY	241
Dicentrarchus	CWTPYYLLGLWYFFFDDLEGKVSHSLTHILFIFGLVNACLDPVIYGLFTIHFRTGLRRY	346
Morone	CWTPYYLLGLWYFFFDDLEGKVSHSLTHILFIFGLVNACLDPVIYGLFTIHFRTGLRRY	346
Seriola	CWTPYYLLGLWYFFFDDLEGKVSHSLTHILFIFGLVNACLDPVIYGLFTIHFRTGLRRY	346
Pseudopleuronectes	CWTPYYLLGLWYFFFDDLEGKVSQSLTHILFIFGLLSACLDPVIYGLFTIHFRTGLRRY	335
Colisa	CWTPYYLLGLWYFFFDDLEGKVSHSLSHILFIFGLVNACVDPVIYGLFTIHFRTGLRQRY	335
OreochromisA	CWTPYYLLGLWYFFFDDLEGKVSHSLTHILFIFGLVNACLDPLIYGLFTIHFRTGLRRF	346
Astatotilapia	CWTPYYLLGLWYFFFDDLEGKVSHSLTHILFIFGLVNACLDPLIYGLFTIHFRTGLRRF	346
Predicted	CWTPYYLLGLWYFFFDDLEGKVSHSLTHILFIFGLVNACLDPLIYGLFTIHFRTGLRRF	360
OreochormisN	CWTPYYLLGLWYFFPGDLEGKVSHSLTHILFIFGLVNACLDPLIYGLFTIHFRTGLRRF	346
Fundulos	CWTPYYLLGLWYFFFDDLEGKVSHSLTHILFIFGLVNACLDPVIYGLFTIHFRTGLRRY	340
	***** : ***** : ** : ***** : . * : ** : **	

Fig 17: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del GnRH-R2 de *Ch. humboldtianum* con las secuencias de aminoácidos de *Odontesthes bonariensis*, *Acanthopagrus schlegelii*, *seriola dumerilii*, *Morone saxatilis*, *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*, *Oreochromis niloticus*, *Astatotilapia burtoni*, *Pseudopleuronectes americanus*, *Oreochromis niloticus*, *Colisa lalia* y *Fundulos heteroclitus*. En los recuadros rojos se encuentran los aminoácidos mutados.

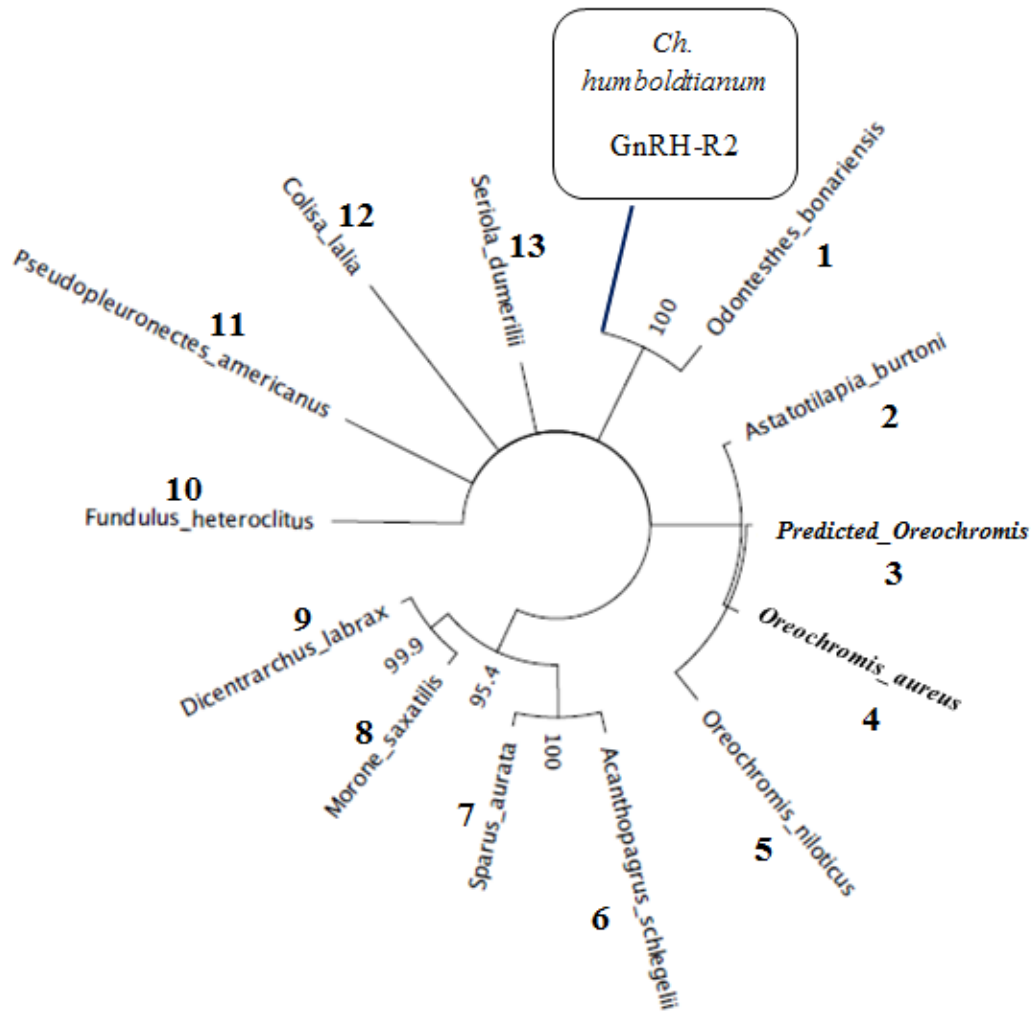


Fig 18: Árbol filogenético de GnRH-R2 en teleósteos, deducido de la secuencia de aminoácidos, usando el método del neighbor-joining mediante el programa Mrbayes (3.1). Los números indican la probabilidad posterior después de 1,100,000 réplicas. (1-*Odontesthes bonariensis*, 2-*Astatotilapia burtoni*, 3-*Predicted Oreochromis*, 4-*Oreochromis aureus*, 5-*Oreochromis niloticus*, 6-*Acanthopagrus schlegelii*, 7-*Sparus aurata*, 8-*Morone saxatilis*, 9-*Dicentrarchus labrax*, 10-*Fundulus heteroclitus*, 11-*Pseudopleuronectes americanus*, 12-*Colisa lalia*, 13-*Seriola dumerilii*).

## 9.- CONCLUSIONES

Se lograron aislar por primera vez dos secuencias parciales correspondientes a los dos subtipos del receptor a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH-R). La secuencia de 216 pb obtenida del GnRH-R1 de *Ch. humboldtianum* se encontró presente en encéfalo y gónadas en etapas de recrudescencia, madurez y regresión, presentando una similitud del 90% con el GnRH R1B de *Odontesthes bonariensis* y del 88% con *Astatotilapia burtoni*, la secuencia de 425 pb obtenida del GnRH-R2 de *Ch. humboldtianum* se encontró presente únicamente en muestras de encéfalo en etapa de recrudescencia tardía, presentando una similitud del 92% con el GnRH R2A de *Odontesthes bonariensis* y del 88% con *Seriola dumerilii* y *Morone saxatilis*.

La secuencia analizada del GnRH-R1 presentó seis puntos mutacionales en comparación con otras secuencias de teleósteos, tres en la región del ICL3 (Q, V y L), dos en la TM6 (R, S) y uno en el ECL3 (A).

La secuencia analizada correspondiente al GnRH-R2 presentó dos puntos mutacionales en la región del ICL3 (Q y K).

## **10.- PERSPECTIVAS**

La secuenciación de los GnRH-Rs ha permitido identificar subtipos para este receptor presentes en el encéfalo de *Ch. humboldtianum* y en gónadas, sin embargo se requieren más estudios para obtener la secuencia completa de estos receptores a fin de establecer una mejor relación filogenética que posteriormente permitirá establecer la relación evolutiva que guardan estas moléculas, estudios cuantitativos tanto de los receptores como de sus ligandos por medio de qPCR así como estudios de distribución y afinidad permitirán comprender la relación que guardan los diferentes subtipos de receptores con los sistemas de ligandos, y posteriormente el mecanismo de activación de cada uno. La comprensión de esta ruta reproductiva contribuirá a facilitar el cultivo de estos organismos.



## 11.- REFERENCIAS

Adelman, J. P., Mason, A. J., Hayflick, J. S., Seeburg, P.H., 1986. Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 179-183.

Alestrom, P., Kisen, G., Klungland, H., Andersen, O., 1992. Fish gonadotropin releasing hormone gene and molecular approaches for control of sexual maturation: development of a transgenic fish model. *Mol. Mar Biol. Biotechnol.* 1, 376-379.

Amano, M., Oka, Y., Yamanome, T., Okuzawa, K., Yamamori, K., 2002. Three GnRH systems in the brain and pituitary of a pleuronectiform fish, the barfin flounder *Verasper moseri*. *Cell Tissue Res.* 309, 323-329.

Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellows, R., Guillemin, R., 1971. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 205-210.

Andersen, A. C., Danger, J.M., Fasolo, A., Kah, O., Tonon, M.C., Vaudry, H., 1988. Immunohistochemical localization of gonadotropin-releasing-hormone-associated peptide in the brain of the frog. *J. Comp. Neurol.* 273, 241-251.

Benoit, J., Assenmacher, I., 1952. Influence of high and low lesions of the in fundibulum on gonad stimulation in the domestic drake. C. R. Hebd Seances. Acad. Sci. 235, 1547-1549.

Blomenrohr, M., Heding, A., Sellar, R., Leurs, R., Bogerd, J., Eidne, K. A., Willars, G. B., 1999. Pivotal role for the cytoplasmic carboxyl-terminal tail of a nonmammalian gonadotropin-releasing hormone receptor in cell surface expression, ligand binding, and receptor phosphorylation and internalization. Mol. Pharmacol. 56, 1229-1237.

Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A., Fagni, L., 2003. The magic tail of G-protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. FEBS Lett. 546, 65-72.

Bockaert, J., Pin, J. P., 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. The EMBO J. Vol. 18 No. 7, 1723-1729.

Bogerd, J., Diepenbroek, W. B., Hund, E., Oosterhout, F., Teves, A. C. C., Leurs, R., Blomenrohr, M., 2002. Two gonadotropin-releasing hormone receptors in the African Catfish: no differences in ligand selectivity, but differences in tissue distribution. Endocrinol. 143, (12): 4673-4682.

Breton, B., Jalabert, B., Billard, R., Weil, C., 1971. In vitro stimulation of the release of pituitary gonadotropic hormone by a hypothalamic factor in the carp *Cyprinus carpio* L. C R Acad. Sci. Hebd Seances Acad. Sci. D 273, 2591-2594.

Bruce, A., Johnson, J., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., 2008. Molecular biology of the cell. Fifth edition. Garland Science. Taylor & Francis Group. USA p. 911.

Chen, C. C., Fernald, R. D., 2008. GnRH and GnRH receptors: distribution, function and evolution. *J. of Fish Biol.* 73, 1099-1120.

Chow, M.M., Kight, K. E., Gothilf, Y., Alok, D., Stubblefield, J., Zohar, Y., 1998. Multiple GnRHs present in a teleost species are encoded by separate genes: analysis of the sbGnRH and cGnRH-II genes from the striped bass, *Morone saxatilis*. *J. Mol. Endocrinol.* 21, 277-289.

Confente, F., Rendón, M. C., González de canalaes, M. L., Muñoz-Cueto, J. A., 2005. Neuropeptidergic and aminergic systems in the brain and pituitary of the meagre, *Argyrosomus regius*. 5th Congresso da Associatiao Ibérica de Endocrinologia Comparativa, 8-10 september. Faro, Portugal.

Conn, P. M., Aguirre, A., 2009. Trafficking of G-protein-coupled receptors to the plasma membrane: insights for pharmacoperone drugs. *Trends in Endocrinol. Metablism.* Vol. 21 No. 3. 190-197.

Conn, P. M., Janovick, J. A., 2009. Trafficking and quality control of the gonadotropin releasing hormone receptor in health and disease. *Mol. Cell Endocrinol.* 27; 299(2), 137-145.

Dong, Ch., Filipeanu, C., M., Duvernay, M. T., Wu, G., 2007. Regulation of G protein-coupled receptor export trafficking. *Biochim. Biophys. Acta.* 1768(4), 853-870.

Donovan, B.T., Harris, G. W., 1954. Effect of pituitary stalk section light-induced oestrus in the ferret. *Nature.* 174, 503-504.

Dubois, E. A., Zandbergen, M. A., Peute, J., Goos, H. J., 2002. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain Res. Bull.* 57, 413-418.

Fernald, R. D., White, R. B., 1999. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Front. Neuroendocrinol.* 20, 224- 240.

Flanagan, C. A., Chen, C., Coetsee, M., Mamputha, S., Whitlock, K. E., Bredenkamp, N., Grosenick, L., Fernald, R. D., Illing, N., 2007. Expression, structure, function, and Evolution of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Receptors GnRH-R1<sup>SHS</sup> and GnRH-R2<sup>PEY</sup> in the Teleost, *Astatotilapia burtoni*. *Endocrinol.* 148(10), 5060-5071.

González-Martínez. D., Mandigou, T., Zmora, N., Anglade, I., Zanuy, S., Zohar, Y., Elizur, A., Muñoz-Cueto, J. A., Kah, O., 2001. Differential expression of three different prepro-GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Comp. Neurol.* 429, 144-155.

Gothilf, Y., Muñoz-Cueto, J. A., Sagrillo, C. A., Selmanoff, M., Chen, T. T., 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.

Guilgur, L. G., Moncaut, N. P., Canário, A. V. M., Somoza, G. M., 2006. Evolution of GnRH ligands and receptors in gnathostomata. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 144, 272 – 283.

Heding, A., Vrecl, M., Bogerd, J., McGregor, A., Sellar, R., Taylor, P. L., Eidne, K. A., 1998. Gonadotropin-releasing hormone receptors with intracellular carboxyl-terminal tails undergo acute desensitization of total inositol phosphate production and exhibit accelerated internalization kinetic. *J. Biol. Chem.* 273, 11472-11477

Illing, N., Troskie, B. E., Nahorniak, C. S., Hapgood, J. P., Peter, R. E., Millar, R. P., 1999. Two gonadotropin-releasin hormone receptor subtypes with distinct ligand selectivity and differential distribution in brain pituitary in the goldfish (*Carassius auratus*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 2526-2531.

Kakar, S. S., Musgrove, L. C., Devor, D. C., Sellers, J. C., Neill, J. D., 1992. Cloning, sequencinig, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem. Biophys. Resp. Commun.* 189: 289-295.

Kavanaugh, S. I., Nozaki, M., Sower, S. A., 2008. Origins of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in vertebrates: identification of a novel GnRH in a basal vertebrate, the sea lamprey. *Endocrinol.* 149, 3860-3869.

Kenaki, T., 1995. Agonist-receptor efficacy II agonist trafficking of receptor signals. *Trends. Pharmacol. Sci.* 16: 232-338.

Kha, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L. G., Vaillant, C., Lareyre, J. J., 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa; a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153, 346-364.

Koenig, J. A., Edwarson, J. M., 1997. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 18, 276-287.

- Lethimonier, C., Madigou, T., Cueto, J. A. M., Lareyre, J. J., Kah, O., 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *Gen. and Comp. Endocrinol.* 135, 1-16.
- Levavi, S. B., Bogerd, J., Mañanos, E. L., Gómez, A., Lareyre, J. J., 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 412-437.
- Lynch, M., Force, A., 2000. The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154, 459-473.
- Mandigou, T., Mañanos-Sánchez, E., Hulshof, S., Anglade, I., Zanuy, S., Kah, O., 2000. Cloning, tissue distribution, and central expression of the gonadotropin-releasing hormone receptor in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* 63, 1857-1866.
- Mandigou, T., Uzbekova, S., Lareyre, J. J., Kah, O., 2002. Two messenger RNA isoforms of the gonadotropin-releasing hormone receptor, generated by alternative splicing and/or promoter usage, are differentially expressed in rainbow trout gonads during gametogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 151-160.
- Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R.M., Arimura, A., Schally, A. V., 1971. Structure of the porcine LH and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 1334-1339.
- McArdle, C. A., Franklin, J., Green, L., Hislop, J. N., 2002. Signalling, cycling and desensitisation of gonadotrophin-releasing hormone receptors. *J. of Endocrinol.* 173, 1-11.
- Millar, R. P., Lu, Z., Pawson, A. J., Flanagan, C. A., Morgan, K., Maudsley, S. R., 2004. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine Reviews.* 25(2), 235-275.

Millar, R., Lowe, S., Conklin, D., Pawson, A., Maudsley, S., Troskie, B., Ott, T., Millar, M., Lincoln, G., Sellar, R., Faurholm, B., Scobie, G., Kuestner, R., Terasawa, E., Katz, A., 2001. A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 9636-9641.

Millar, R., P., 2002. GnRH II and type II GnRH receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* 14, 35-43.

Mohamend, J.S., Thomas, P., Khan, I. A., 2005. Isolation, cloning, and expression of three prepro- GnRH mRNAs in Atlantic croaker brain and pituitary. *J. Comp. Neurol.* 488, 384-395.

Moncaut, N., Somoza, G. M., Power, D., Canario, A., 2005a, Five gonadotropin-releasing hormone receptor in a teleost fish: isolation, tissue, distribution and phylogenetic relationships. *J. Mol. Endocrinol.* 34, 767-779.

Neill, J. D., Duck, L. W., Sellers, J. C., Musgrove, L. C., 2001. A gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor specific for GnRH II in primates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 1012-1018.

O'Neill, D. F., Powell, J. F., Standen, E. M., Youson, J. H., Warby, C. M., Sherwood, N.M., 1998. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ancient teleosts, the bonylongue fishes: putative origins of salmon GnRH. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112, 415-425.

Okubo, K., Amano, M., Yoshimura, Y., Suetake, H., Aida, K., 2000a. A novel form of gonadotropin-releasing hormone in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 298-303.

Okubo, K., Ishii, S., Ishida, J., Mitani, H., Naruse, K., Kondo, M., Shima, A., Tanaka, M., Asakawa, S., Shimizu, N., Aida, K., 2003. A novel third gonadotropin-releasing hormone receptor in the medaka *Oryzias latipes*: evolutionary and functional implications. *Gene* 314, 121-131.

Okubo, K., Mitani, H., Naruse, K., Kondo, M., Shima, A., Tanaka, M., Asakawa, S., Shimizu, N., Yoshiura, Y., Aida, K., 2002. Structural characterization of GnRH loci in the medaka genome. *Gene* 293, 181-189.

Okubo, K., Nagahama, Y., 2008. Structural and functional evolution of gonadotropin-releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiol. (Oxf)* 193, 3-15.

Okubo, K., Nagata, S., Ko, R., Kataoka, H., Yoshimura, Y., Mitani, H., Kondo, M., Naruse, K., Shima, A., Aida, K., 2001. Identification and characterization of two distinct GnRH subtypes in a teleost, the medaka *Oryzias latipes*. *Endocrinol.* 142, 4729-4739.

Okubo, K., Suetake, H., Aida, K., 1999. Expression of two gonadotropin-releasing hormone (GnRH) precursor genes in various tissues on the Japanese eel and evolution of GnRH. *Zool. Sci.* 16, 471-478.

Okuzawa, K., Granneman, J., Bogerd, J., Goos, H. H. Th., Zohar, Y., Kagawa, H., 1997. Distinct expression of GnRH genes in the red seabream brain. *Fish Physiol. Biochem.* 17, 71-79.

Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., Miyano, M., 2000.



Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* Aug 4; 289(5480): 739-745.

Pandolfi, M., Muñoz-Cueto, J.A., Lo Nostro, F. L., Downs, J. L., Paz, D.A., Maggese, M. C., Urbanski, H. F., 2005. GnRH systems of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae) revisited: a localization study with antibodies and riboprobes to GnRH-associated peptides. *Cell Tissue Res.* 321, 219-232.

Parhar, I.S., Ogawa, S., Sakuma, Y., 2005. Three GnRH receptor types in laser-captured single cells of the cichlid pituitary display cellular and functional heterogeneity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 2204-2209.

Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J. P., Landau, E. M., 1997. X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* Sep. 12; 277 (5332): 1676-1681.

Rangaraju, N. S., Xu, J. F., Harris, R. B., 1991. Pro-gonadotropin-releasing hormone protein is processed within hypothalamic neurosecretory granules. *Neuroendocrinology* 53, 20-28.

Riezman, H., 1998. Down regulation of yeast G protein-coupled receptors. *Semin. Cell Dev. Biol.* Apr; 9(2): 129-134.

Rispoli, L. A., Nett, T. M., 2005. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor: structure, distribution and regulation of expression. *Animal Reproduction science.* 88, 57-74.

Rojas, C. P.M., Sasso, Y. L. F., 2005. El pescado blanco. *Rev. Dig. Univ.* 8, 2-18.

Ronacher, K., Matsiliza, N., Nkwanyana, N., Pawson, A. J., Adam, T., Flanagan, C. A., Millar, R. P., Katz, A. A., 2004. Serine residues 338 y 339 in the carboxil-terminal tail of the type II gonadotropin-releasing hormone receptor arecritical for  $\beta$ -arrestin-independent internalization. *Endocrinology* 145, 4480-4488.

Sherwood, N. M., Adams, B. A., 2005. Gonadotropin-releasing hormone in fish: evolution, expression and regulation of the GnRH gene. In: Melamed, P., Sherwood, N. (Eds), *Hormones and their receptors in fish reproduction*. World Scientific Publishing Co., Singapore, 1-39.

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.

Silver, M. R., Nucci, N. V., Root, A. R., Reed, K. L., Sower, S. A., 2005. Cloning and characterization of a functional type II GnRH receptor with a lengthy carboxil-terminal tail from an ancestral vertebrate, the sea lamprey. *Endocrinology* 146, 3351-3361.

Somoza, G. M., Miranda, L.A., Strobl-Mazzulla, P., Guilgur, L. G., 2002. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH): from fish to mammalian brains. *Cell. Mol. Neurobiol.* 22, 589-609.

Sower, S. A., Freamat, M., Kavanaugh S. I., 2009. The origins of the vertebrate hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) and hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) endocrine systems: new insights from lampreys. *Comp. Endocrinol. Sep 15; 163(3): 342-343.*

Stefano, A. U., Aldana-Marcos, H. J., Affanni, J. M., Somoza, G.M., 2000. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems in the pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). *Fish Physiol. Biochem.* 215, 23-223.

Tello J. A., Wu, S., Rivier, J. E., Sherwood, N. M., 2008. Four functional GnRH receptors in zebrafish: analysis of structure, signaling, synteny and phylogeny. *Integr. Comp. Biol.* Nov; 48 (5): 570-587.

Troskie, B., Illing, N., Rumbak, E., Sun, Y. M., Hapgood, J., Sealfo, S., Conklin, O., Millar, R., 1998. Identification of three putative GnRH receptors subtypes in vertebrates. *General and Comparative Endocrinology.* 112, 296-302.

Tsai, P.S., 2006. Gonadotropin-releasing hormone in vertebrates: structure, function, and evolution. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148, 48-53.

Tsai, P.S., Zhang, L., 2008. The emergence and loss of gonadotropin-releasing hormone in protostomes: orthology, phylogeny, structure, and function. *Biol. Reprod.* 79, 798-805.

Tsutsumi, M., Zhou, W., Millar, R. P., Mellon, P. L., Roberts, J. L., Flanagan, C. A., Dong, K., Gillo, B., Sealfo, S. C., 1992. Cloning and functional, expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* 6, 1163-1169.

Vickers, E.D., Laberge, F., Adams, B. A., Hara, T.J., Sherwood, N. M., 2004. Cloning and localization of three forms of gonadotropin-releasing hormone, including the novel whitefish form, in a Salmonid, *Coregonus clupeaformis*. *Biol. Reprod.* 70, 1136-1146.

Wang, L., Bogerd, J., Choi, H. S., Seong, J. Y., Soh, J. M., Chun, S. Y., Blumenröhr, M., Troskie, B. E., Millar, R.P., Yu, W. H., McCann, S. M., Kwon, H. B., 2001a. Three

distinct types of GnRH receptors characterized in the bullfrog. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98. 361-366.

White, R. B., Fernald, R. D., 1998. Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression reveals distinct origin for GnRH-containing neurons in the midbrain. Gen. Comp. Endocrinol. 112, 332-329.

White, S. A., Kasten, T.L., Bond, C.T., Adelman, J. P., Fernald, R.D., 1995. Three gonadotropin-releasin hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 8363-8367.

Zhang, L., Tello, J. A., Zhang, W., Tsai, P. S., 2008. Molecular cloning, expression pattern, and immunocytochemical localization of a gonadotropin-releasing hormone-like molecule in the gastropod mollusk, *Aplysia californica*. Gen Comp. Endocrinol. 156, 201-209.

Zmora, N., González-Martínez, D., Muñoz-Cueto, J. A., Mandigou, T., Mananos-Sanchez, E., Doste, S. Z., Zohar, Y., Kah, O., Elizur, A., 2002. The GnRH system in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). J. Endocrinol. 172, 105-116.

Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J. A., Elizur, A., Kah, O., 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol. Feb 1; 165(3): 438-55.

Zohar, Y., Mylonas, C. C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish; from hormones to genes. Aquaculture. 197, 99-136.