

Tesis de Posgrado

Caracterización bioquímica de las variantes de GnRH (gonadotropin-releasing hormone) presentes en cerebro e hipófisis de pejerrey, *Odontesthes bonariensis* : Localización neuroanatómica y relación con distintas hormonas hipofisarias

Stefano, Andrea Virginia

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Stefano, Andrea Virginia. (1999). Caracterización bioquímica de las variantes de GnRH (gonadotropin-releasing hormone) presentes en cerebro e hipófisis de pejerrey, *Odontesthes bonariensis* : Localización neuroanatómica y relación con distintas hormonas hipofisarias. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3134_Stefano.pdf

Cita tipo Chicago:

Stefano, Andrea Virginia. "Caracterización bioquímica de las variantes de GnRH (gonadotropin-releasing hormone) presentes en cerebro e hipófisis de pejerrey, *Odontesthes bonariensis* : Localización neuroanatómica y relación con distintas hormonas hipofisarias". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3134_Stefano.pdf



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biología

Tesis Doctoral

**Caracterización bioquímica de las variantes de GnRH
(gonadotropin-releasing hormone) presentes en cerebro
e hipófisis de pejerrey, *Odontesthes bonariensis*.
Localización neuroanatómica y relación con distintas
hormonas hipofisarias.**

Autor: Lic. Andrea Virginia Stefano

Director: Dr. Gustavo Manuel Somoza

1999
Instituto de Neurociencia
UBA-CONICET

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biología

Doctoral Thesis

**Characterization of GnRH (gonadotropin releasing-hormone)
variants in the brain and pituitary gland of pejerrey,
Odontesthes bonariensis. Neuroanatomical localization and
relation with different pituitary hormones.**

Author: Lic. Andrea Virginia Stefano

Director: Dr. Gustavo Manuel Somoza

1999

**Instituto de Neurociencia
UBA-CONICET**

Abstract

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) variants were characterized by gradient reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) and radioimmunoassays with different antisera in brain and pituitary extracts of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). The results showed that three forms of GnRH are expressed in brain tissue: two of them are chromatographic and immunologically similar to cGnRH-II (chicken) and sGnRH (salmon) while the third GnRH appeared to be different from the eleven known forms of the vertebrate hormone. This novel form is the only variant present in pituitary gland extracts.

The distribution of GnRH neurons and fibers in the brain was demonstrated with immunocytochemical methods using specific antisera. The results indicate that ir-GnRH perikarya were observed in three different nucleus: *nucleus olfactoretinalis*, *nucleus preopticus periventricularis* and in the midbrain tegmentum.

Immunoreactive GnRH (ir-GnRH) fibers reached the three areas of the adenohypophysis: *rostral pars distalis*, *proximal pars distalis* and *pars intermedia*. A close association between ir-GnRH fibers with growth hormone (GH) and prolactin (PRL) cells in the pituitary gland was also demonstrated. Furthermore, colocalization of GnRH receptors with somatotropin and prolactin expressing cells in pituitary primary cell culture was also shown.

Trabajos que surgieron a partir de la realización de esta Tesis Doctoral:

Stefano, A.V., Fridman, O., Somoza, G.M. (1995) Chromatographic and immunological evidence for a third form of GnRH in addition to cII GnRH and sGnRH in the brain of *Odontesthes bonariensis*. Atheriniformes. Proceedings of Reproductive Physiology of Fish. Pg. 79

Somoza G.M., Paz, D.A., Stefano, A.V., Affanni, J.M (1995). Identification of immunoreactive mammalian gonadotropin-releasing hormone (mGnRH) in the brain of metamorphic larvae of *Bufo arenarum*. Hensel (Amphibia : Anura) International Journal of Development Neuroscience 14(5) :663-672.

D'Eramo, J.L., Somoza, G.M., Stefano, A.V., Canosa, L.F., Fridman O. (1996). Rapid separation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) molecular forms by isocratic high-performance liquid chromatography on an ion-exchange column. Journal of Chromatography B : Biomedical Applications. 682 (2) :213-224.

Stefano, A.V., Canosa, L.F., D'Eramo, J.L., Fridman, O., Affanni, J.M., Somoza, G.M. GnRH molecular variants in the brain and pituitary gland of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). Immunological and chromatographic evidence for the presence of a novel molecular variant (1997). Comparative Biochemistry and Physiology. 118C :335-345.

Vissio, P.G.; Stefano, A.V.; Somoza, G.M.; Maggese, M.C. & Paz, D.A. (1997). Close association among GnRH (gonadotropin-releasing hormone) fibers and GtH, GH and somatolactin expressing cells in pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atheriniformes). Taller Internacional sobre la Bioquímica en la Biotecnología Marina. La Havana. Cuba. Abstract p. 39.

Stefano, A.V.; Aldana-Marcos, H.; Affanni, J.M. & Somoza, G.M. (1997). Localización neuroanatómica de sistemas de GnRH (gonadotropin-releasing hormone)-érgicos en cerebro e hipófisis del pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (teleostei, Atheriniformes) Xmo Congreso de la Sociedad Argentina de Endocrinología y Metabolismo. Buenos Aires. Abstract p. 78

Stefano, A.V.; Vissio, P.G., Paz, D.A.; Somoza, G.M.; Maggese, M.C. & Barrantes, G.E. (1998). *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes) pituitary cells in primary culture: colocalization of GnRH receptors with gonadotropins, somatotropin, somatolactin and prolactin expressing cells . 19th Conference of European Comparative Endocrinologists. European Society for Comparative Endocrinology. 1-6 Octubre. University of Nijmegen. Holanda. Abstract, p.66

Vissio, P.G.; Stefano, A.V.; Paz, D.A.; Somoza, G.M.; Berassain, G.; Maggese, M.C. & Barrantes, G.E. (1998). Morphological characterization of gonadotropin, growth hormone, prolactin and somatolactin cells in pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) pituitary-cell cultures. VII Congreso Iberoamericano de Biología Celular. 26-30 Octubre. Montevideo. Uruguay. Abstract.

Vissio, P.G.; Stefano, A.V.; Somoza, G.M.; Maggese, M.C. & Paz, D.A. (1999). Close association among GnRH (gonadotropin-releasing hormone) fibers and GtH, GH, SL and PRL expressing cells in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. Enviado.

Introducción General

Los peces son el grupo de vertebrados con origen evolutivo más temprano y presentan además, la mayor diversidad de especies (aproximadamente 21723 especies) (Nelson, 1994). Surgieron hace 500 millones de años y colonizaron los ambientes más variados, desde aguas dulces a aguas marinas, desde mares polares a tropicales y desde aguas superficiales a aguas profundas. Poder elucidar las estrategias evolutivas y los mecanismos que los peces utilizan para adaptarse a distintos ambientes, es uno de los desafíos más excitantes para la biología moderna.

Por otro lado, los peces sirvieron como modelos experimentales en distintas áreas de la biología: neurobiología, endocrinología, embriología, toxicología acuática, carcinogénesis, adaptaciones bioquímicas y genéticas entre otras. Algunos de estos estudios fueron claves en el desarrollo de estas disciplinas.

En nuestro país es difícil encontrar estudios bioquímicos y moleculares acerca de la endocrinología de la reproducción de peces endémicos. Una de las especies de mayor importancia en la economía pesquera de agua dulce de nuestro país es el pejerrey bonaerense, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier *et* Valenciennes, 1835), Sub-división: Teleostei, Infra-división: Euteleostei, Superorden: Acanthopterygii, Order: Atheriniforme, Familia: Atherinidae.

Los estudios sobre la reproducción de esta especie se han centrado en aspectos como distribución de sexos, épocas reproductivas, variación de tamaño, tamaño de gónadas etc., pero poco se conoce acerca de la fisiología de la reproducción analizada desde un punto de vista bioquímico y molecular.

Una de las hormonas claves en la regulación de la reproducción de vertebrados es la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). Esta hormona estimula la síntesis y liberación de gonadotrofinas hipofisarias. Se sintetiza en cuerpos neuronales localizados en distintas áreas cerebrales y alcanza la glándula hipófisis directamente (peces teleósteos) o a través del sistema portal hipotálamo-hipofisario (tetrápodos).

Se sabe que los vertebrados (incluidos los peces) expresan más de una variante molecular de GnRH que se sintetizan en distintas áreas cerebrales. La co-

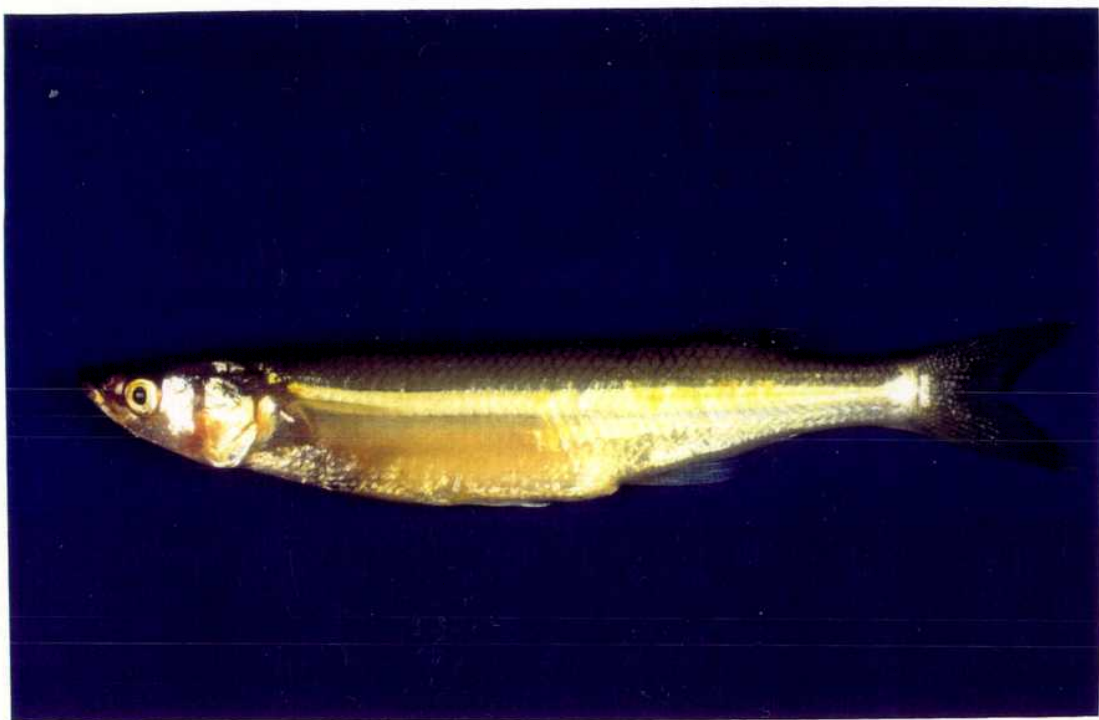


Foto 1: Ejemplar de pejerrey, *Odontesthes bonariensis*

existencia de múltiples variantes de GnRH en el cerebro de un individuo, llevó a la realización de estudios acerca de sus respectivas bioactividades, distribución neuroanatómica, regulación y funciones fisiológicas.

El objetivo principal de esta Tesis consiste en la caracterización de sistemas GnRHérgicos en el pejerrey, siendo los objetivos específicos:

- 1) Identificar las variantes de GnRH en cerebro e hipófisis de pejerrey.
- 2) Localizar las neuronas productoras de las distintas variantes de GnRH.
- 3) Analizar la asociación de las fibras secretoras de GnRH con las células hipofisarias secretoras de GH y PRL y determinar en estas células la presencia de receptores a GnRH.

Este estudio, permitirá en primer lugar, aportar datos acerca de la distribución taxonómica de las formas de GnRH en los vertebrados en un orden, Atheriniformes, donde no existen estudios sobre este tema y probablemente aportar luz sobre la evolución de esta molécula. El pejerrey pertenece a la familia Atherinidae, donde se conocen 29 géneros con aproximadamente 160 especies (Nelson, 1994). No existen hasta el momento estudios de este tipo en algunas de estas especies (King & Millar, 1997).

En segundo lugar, permitirá el estudio de las formas endógenas de GnRH como potenciales armas farmacológicas para la inducción de la ovulación y la espermiación en animales en cautiverio.

El pejerrey presenta un cuerpo hidrodinámico, ahusado, boca pequeña, cabeza cónica y alargada, ojos con párpados, línea lateral doble e irregular y aleta dorsal doble. Su coloración es plateada, con un peso en adultos promedio de 300 gramos, aunque existen ejemplares que llegan a sobrepasar el kilogramo (Foto 1). Su alimentación es básicamente planctónica (Ringuelet, 1967).

Su distribución original comprendía las aguas continentales de la Provincia de Buenos Aires. Posteriormente, fue introducido en otras provincias argentinas y distintos países con propósitos de acuicultura y pesca deportiva (Bonetto & Castello, 1985).

En la Provincia de Buenos Aires en condiciones naturales, esta especie presenta dos períodos de actividad reproductiva: uno principal en primavera que puede comenzar en Julio y terminar en Diciembre, con su climax entre los meses de Septiembre y Octubre y un segundo período más corto en otoño, en los meses de

Marzo y Abril (Ringuelet, 1943). Estos periodos se mantienen en condiciones de cautiverio (Strüssmann, 1989). La amplitud de los periodos de desove, es variable y elástica, de acuerdo a los distintos ambientes ya que se ven afectados por la temperatura del agua y las condiciones alimenticias. Estas variaciones, permiten encontrar individuos maduros en cualquier época del año (Boschi & Fuster de Plaza., 1959; Strüssmann, 1989). El desove se realiza en lugares de poca profundidad y los huevos se adhieren fácilmente a la vegetación acuática sumergida (piedras, pilotes, y cualquier objeto bajo el agua), gracias a los filamentos que presenta su membrana exterior (Saavedra & Piacentino, 1991). El primer desove de una hembra en condiciones óptimas puede liberar entre 2000 a 3000 ovocitos (González Regalado, 1954).

Los primeros intentos en la cría intensiva del pejerrey en nuestro país se desarrollaron a principio de siglo. Pero la falta de tradición en la acuicultura, hábitos de alimentación en la población y la abundancia en stocks naturales, limitaron la continuidad de estos intentos pioneros. Posteriormente, la pesca indiscriminada y la ineficiencia en las técnicas de cría de alevinos conllevó a la depleción de estos stocks naturales.

Para la efectivización de la cría extensiva con propósitos comerciales o deportivos, es necesaria una producción constante de alevinos. En la mayor parte de las especies que actualmente se cultivan o que pueden ser potencialmente cultivables, una producción regular de ovocitos y esperma depende del control de la ovulación, el desove y la espermiación.

En condiciones naturales, los peces pueden presentar distintos patrones de desarrollo folicular ovárico: sincrónico, sincrónico en grupo y asincrónico (Peter & Yu, 1997). Los peces con patrón sincrónico, son aquellos que mueren luego del desove, tienen una estación reproductiva definida y corta, y un desarrollo folicular sincrónico como por ejemplo los salmones del Pacífico pertenecientes al género *Onchorynchus* y la anguila del Mediterráneo (*Anguilla anguilla*). Los que presentan el patrón sincrónico en grupo por ejemplo el goldfish *Carassius auratus* y el medaka (*Oryzias latipes*) que presentan ovarios con grupos de folículos definidos, cada uno en distintos estadios de desarrollo. En este caso, la ovulación y el desove pueden ocurrir una o varias veces en la estación reproductiva, dependiendo de la especie y de las condiciones ambientales. El tercer grupo, como es el caso del pejerrey,

presentan en sus ovarios, ovocitos en todos los estadios madurativos. En este caso, los individuos ovulan y desovan repetidas veces a lo largo de una estación reproductiva prolongada.

La asincronicidad en el desove de las hembras del pejerrey, así como la poca disponibilidad de reproductores, limita en gran medida la efectividad de las técnicas de propagación basadas en la recolección de ejemplares maduros, con la consecuente obtención de gametas y fertilización artificial de las mismas.

El interés en el cultivo del pejerrey y la falta de información sobre su biología han generado la necesidad de realizar estudios básicos para mejorar las tasas de crecimiento, la reproducción y las condiciones de mantenimiento en cautiverio (Strüssmann, 1989). De esta forma, es importante conocer entre otros, los mecanismos neuroendócrinos que regulan la ovulación y espermiación en esta especie de manera de sentar las bases para el desarrollo de técnicas tanto hormonales como ambientales para el manejo de la ovulación y espermiación en cautiverio.

Los estudios realizados en esta Tesis, abarcan aspectos básicos de la fisiología reproductiva del pejerrey: caracterización de las variantes de GnRH presentes en el sistema nervioso central e hipófisis, distribución neuroanatómica de estas variantes, inervación de fibras GnRHérgicas en la hipófisis y determinación de receptores GnRHérgicos en dos tipos celulares hipofisarios (lactotropos y somatotropos). Para la claridad expositiva de esta Tesis, cada capítulo se presentará como un estudio independiente con su correspondiente introducción y conclusión de esta forma se organizó en tres capítulos:

Capítulo 1: Caracterización de variantes de GnRH en el pejerrey.

Capítulo 2: Localización neuroanatómica de las células secretoras de GnRH.

Capítulo 3: Relación entre GnRH y las células hipofisarias productoras de prolactina (PRL) y la hormona de crecimiento (GH).

En resumen, los avances realizados sobre aspectos básicos de la fisiología reproductiva del pejerrey, permitirán en un futuro diseñar estrategias ambientales y hormonales para la inducción de la ovulación y espermiación como así también el control del crecimiento en individuos criados en cautiverio. Además aportará datos acerca de la distribución taxonómica de las formas de GnRH en los vertebrados.

Capítulo I: Caracterización de variantes de GnRH en el pejerrey

I-I Introducción

En vertebrados, GnRH cumple un rol central en el desarrollo y mantenimiento de la función reproductiva estimulando la síntesis y liberación de las gonadotropinas hipofisarias. Esta hormona se sintetiza en determinadas áreas cerebrales alcanzando la glándula hipófisis directamente (como en peces teleósteos) o a través del sistema porta-hipofisario (como en vertebrados tetrápodos).

A partir de la caracterización de la estructura primaria de GnRH en porcinos y ovinos (mGnRH) (Matsuo *et al.*, 1971; Burgus *et al.*, 1972), se logró identificar y secuenciar otras diez variantes en vertebrados. Estas son: lamprey GnRH-I y lamprey GnRH III (lGnRH-I y lGnRH-III respectivamente, Sherwood *et al.*, 1986a, Sower *et al.*, 1993); chicken GnRH-I (cGnRH-I, King & Millar, 1982a y 1982b), chicken GnRH-II (cGnRH-II, Miyamoto *et al.*, 1984); catfish GnRH (cfGnRH) (Ngamvongchon *et al.*, 1992a), dogfish GnRH (dfGnRH) (Lovejoy *et al.*, 1992a), salmon GnRH (sGnRH) (Sherwood *et al.*, 1983), seabream GnRH (sbGnRH) (Powell *et al.*, 1994), herring GnRH (hGnRH) (Carolsfeld *et al.*, 1999) y guinea pig GnRH (gpGnRH) (Jimenez-Liñan *et al.*, 1997). A su vez, se identificó la expresión de una forma hidroxilada de mGnRH, (Hyp⁹)mGnRH, variante originada por una modificación post-traducciona en anfibios y mamíferos (Gautron *et al.*, 1991).

Por otra parte, se han descripto otras dos variantes a partir de tejido nervioso de un protocordado denominadas tunicate GnRH-I (tGnRH-I) y tunicate GnRH-II (tGnRH-II) (Powell *et al.*, 1996a).

Se considera que todas estas moléculas pertenecen a la misma familia debido a las siguientes características comunes:

1. Son deca péptidos.
2. Los extremos amino y carboxilo terminal se encuentran modificados. El extremo amino terminal está ciclado formando un piroglutamato (pGlu), y el extremo carboxilo terminal se encuentra amidado (Gly-amida).
3. Los residuos 1,4,9 y 10 están conservados.

La inalterabilidad de los extremos amino y carboxilo sugiere que estas regiones son relevantes para la unión al receptor, la resistencia a la degradación enzimática y el

disparo de los eventos mediados por receptor en la liberación de las gonadotropinas. Estas características hacen pensar que GnRH es una molécula asociada a la reproducción que apareció hace al menos 500 millones de años con el surgimiento de los agnatos

La secuencia primaria de estos neuropéptidos se detalla en la siguiente tabla:

mGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro-Gly-NH ₂
cGnRH-I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro-Gly-NH ₂
sbGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Ser	Pro-Gly-NH ₂
cfGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro-Gly-NH ₂
sGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro-Gly-NH ₂
hGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Ser	Pro-Gly-NH ₂
gpGnRH	pGlu	Tyr	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Arg	Pro-Gly-NH ₂
dfGnRH	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro-Gly-NH ₂
cGnRH-II	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro-Gly-NH ₂
IGnRH-III	pGlu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro-Gly-NH ₂
IGnRH-I	pGlu	His	Tyr	Ser	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro-Gly-NH ₂
tGnRH-I	pGlu	His	Trp	Ser	Asp	Tyr	Phe	Lys	Pro-Gly-NH ₂
tGnRH-II	pGlu	His	Trp	Ser	Leu	Cys	His	Ala	Pro-Gly-NH ₂

Tabla I-1: Secuencia aminoacídica de las variantes de GnRH.

I-1a Distribución taxonómica de GnRH

Como se dijera anteriormente las variantes de GnRH tomaron su nombre de la especie en la que fue descrita por primera vez, sin embargo posteriormente se demostró que muchas especies pertenecientes a distintos grupos de vertebrados expresaban la misma variante. La mayor parte de estos estudios se realizaron, utilizando cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para separar las variantes de GnRH, en conjunto con radioinmunoensayos (RIA) con antisueros específicos para identificar las variantes, bioensayos en cultivos primarios de células hipofisarias, y ensayos de unión a receptor. Estos análisis indirectos permitieron el análisis de un gran número de especies, aportando información muy valiosa acerca de la distribución taxonómica de las diferentes variantes de GnRH. Muchos de estos datos fueron confirmados definitivamente con la determinación directa de la secuencia aminoacídica.

Hasta hace tres años, los organismos de aparición más temprana en los cuales se identificó la presencia de alguna variante de GnRH, fueron los agnatos. Sin embargo, recientemente se identificaron dos variantes de GnRH en un protocordado: tGnRH-I y tGnRH-II (Powell *et al.*, 1996a).

En agnatos, se identificaron tres variantes de GnRH, denominadas IGnRH-I, II y III. Dos de ellas: IGnRH-I y IGnRH-III han sido ya secuenciadas (Sherwood *et al.*, 1986a; Sower *et al.*, 1993) mientras que de IGnRH-II se conoce su composición pero no su secuencia (Sherwood *et al.*, 1993).

En peces cartilaginosos (Chondrichthyes), se identificaron tanto cGnRH-II como dfGnRH y formas nuevas (Lovejoy *et al.*, 1992a; b; 1993; Powell *et al.*, 1986a). En peces teleósteos (Osteichthyes), se identificó la presencia de cGnRH-II junto con mGnRH, sGnRH, cfGnRH, sbGnRH o una variante nueva de GnRH (Amano *et al.*, 1986; Gothilf *et al.*, 1993; Joss *et al.*, 1994; King 1985, 1990b, 1995a; Ngamvongchon *et al.*, 1992a; Powell *et al.*, 1986a; Sherwood *et al.*, 1983; 1984; 1989; 1991; Yu *et al.*, 1988). Algunas especies expresan tres variantes de GnRH: cGnRH-II, sGnRH, con sbGnRH o con una variante nueva (Grober *et al.*, 1992; Miranda *et al.*, 1998; Powell *et al.*, 1994; Sherwood *et al.*, 1993b; Somoza *et al.*, 1994).

En los anfibios (Amphibia) estudiados, se determinó la expresión de tres formas de GnRH: cGnRH-II, mGnRH, y una variante nueva con propiedades similares a sGnRH (Conlon *et al.*, 1993; King & Millar, 1986; Miranda *et al.*, 1998; Muske & Moore 1994; Muske *et al.*, 1994; Northcutt *et al.*, 1994; Sherwood *et al.*, 1986b; Somoza *et al.*, 1996).

En reptiles (Reptilia) estudiados, predominan cGnRH-I y cGnRH-II, aunque también existen evidencias de la presencia de variantes nuevas (Powell *et al.*, 1985; 1986b; Sherwood *et al.*, 1988; Tsai & Licht, 1993). Mientras que en aves (Aves), sólo se describió la presencia de cGnRH-I y cGnRH-II (King *et al.*, 1982a; 1982b; Mikami *et al.*, 1988; Millan *et al.*, 1993; Miyamoto *et al.* 1984; Powell *et al.*, 1987).

En mamíferos (Mammalia), se han identificado dos formas moleculares de GnRH: mGnRH y cGnRH-II. En varias especies de metaterios (King *et al.*, 1989; 1990a; 1994) y en algunas especies de euterios de evolución temprana como los insectívoros (Dellovade, *et al.*, 1993; Kasten, *et al.*, 1996) están presentes cGnRH-II y mGnRH, mientras que en la mayoría de las especies de euterios más evolucionados ha sido identificada solamente mGnRH (King *et al.*, 1988; Kelsall, *et al.*, 1990; Gautron, *et al.*, 1991; Rodríguez Gil *et al.*, en elaboración); aunque recientemente se determinó la presencia de cGnRH-II en distintas especies de este grupo (Chen *et al.*, 1998, Lesheid, *et al.*, 1997; Montaner *et al.*, 1998; 1999, White *et al.*, 1998b).

De todos estos estudios pueden sacarse dos conclusiones:

Tabla 1-2: Distribución taxonómica de GnRH

Especies	Variante Molecular de GnRH	Ti	TII	TIII	P	Tipo de identificación	Autores
Urochordata							
<i>Chelyosoma productum</i>							Powell <i>et al.</i> , 1996a
Vertebrata							
Agnatha							
<i>Petromyzon marinus</i>	LI LIII						Sherwood <i>et al.</i> , 1986a; Sower <i>et al.</i> , 1993
Chondrichthyes							
<i>Hydrolagus collii</i>							Lovejoy <i>et al.</i> , 1991a
<i>Torpedo marmorata</i>							King <i>et al.</i> , 1992
<i>Squalus acanthias</i>							Lovejoy <i>et al.</i> , 1992
<i>Scyliorhinus canicula</i>							D'Antonio <i>et al.</i> , 1995
<i>Pardneria africana</i>							Powell <i>et al.</i> , 1986
Osteichthyes							
<i>Calamoichthys calabaricus</i>							Sherwood <i>et al.</i> , 1991
<i>Acipenser gueldastaedi</i>							Lescheid <i>et al.</i> , 1995
<i>Acipenser transmontanus</i>							Sherwood <i>et al.</i> , 1991
<i>Lepisosteus spatula</i>							Sherwood <i>et al.</i> , 1991
<i>Anguilla anguilla</i>							King <i>et al.</i> , 1990
<i>Clarias gariepinus</i>							Sherwood <i>et al.</i> , 1989
<i>Clupea harengus pallasi</i>							Ngamvongchon <i>et al.</i> , 1992a
<i>Chanos chanos</i>							Sherwood <i>et al.</i> , 1997b
<i>Carassius auratus</i>							Sherwood <i>et al.</i> , 1984
<i>Symbranchius marmoratus</i>							Yu <i>et al.</i> , 1988
<i>Onchorynchus keta</i>							Ravaglia <i>et al.</i> , 1997
<i>Onchorynchus masou</i>							Sherwood <i>et al.</i> , 1983
<i>Salmo gairdneri</i>							Amano <i>et al.</i> , 1992
<i>Brachydanis rerio</i>							Sherwood <i>et al.</i> , 1984; Okusawa <i>et al.</i> , 1990
<i>Orzias latipes</i>							Powell <i>et al.</i> , 1996
<i>Sebastes rastrelliger</i>							Powell <i>et al.</i> , 1996
<i>Merluccius capensis</i>							King & Millar, 1985

<i>Gadus morhua morhua</i>	CII	S		P	Wu <i>et al.</i> , 1986
<i>Tilapia sparrmannii</i>	CII	S		HyR	King & Millar, 1985
<i>Coris julis</i>	CII	S		HyR	Powell <i>et al.</i> , 1986
<i>Centropomus striatus</i>	CII	S		HyR	Sherwood <i>et al.</i> , 1993
<i>Mugil cephalus</i>	CII	S	Sb	HyR	Sherwood <i>et al.</i> , 1984
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	CII	S	Sb	P	Powell <i>et al.</i> , 1997
<i>Prochilodus lineatus</i>	CII	S	Sb	HyR	Somoza <i>et al.</i> , 1994
<i>Centropomus undecimalis</i>	CII	S	Sb	HyR	Sherwood <i>et al.</i> , 1993
<i>Haplochromis burtoni</i>	CII	S	Sb	HyR; cDNA	Powell <i>et al.</i> , 1995; White <i>et al.</i> , 1995
<i>Spaurus aurata</i>	CII	S	Sb	HyR; cDNA	Powell <i>et al.</i> , 1994; Gothilf <i>et al.</i> , 1995
<i>Morone saxatilis</i>	CII	S	Sb	cDNA	Gothilf <i>et al.</i> , 1995
<i>Pseudochaemichthys georgianus</i> CII		S	Sb	HyR	Miranda <i>et al.</i> , 1998
<i>Chaenocephalus aceratus</i> CII		S	Sb	HyR	Miranda <i>et al.</i> , 1998
<i>Notothenia rossi</i>	CII	S	Sb	HyR	Miranda <i>et al.</i> , 1998
<i>Neroceratodus forsteri</i>	CII	M	Sb	HyR	Joss <i>et al.</i> , 1994
<i>Protopterus annaciens</i>	CII	M		HyR	King <i>et al.</i> , 1995
<i>Lepomis gibbosus</i>	CII	S	Sb	HyR; P	Powell <i>et al.</i> , 1995
Amphibia					
<i>Bufo arenarum</i>	M			HyR	Somoza <i>et al.</i> , 1996
<i>Taricha granulosa</i>	M			HyR	Muske <i>et al.</i> , 1994
<i>Ambystoma mexicanum</i>	M			ICQ	Northcutt <i>et al.</i> , 1994
<i>Xenopus laevis</i>	M			HyR	King <i>et al.</i> , 1994
<i>Rana pipiens</i>	M			HyR	Licht <i>et al.</i> , 1987
<i>Rana esculenta</i>	M			HyR	Licht <i>et al.</i> , 1987
<i>Rana ridibunda</i>	M			HyR; P	Licht <i>et al.</i> , 1987; Conlon <i>et al.</i> , 1993
Reptilia					
<i>Pseudemys scripta</i>	CII			HyR	Sherwood <i>et al.</i> , 1988
<i>Trachemys scripta</i>	CII			HyR	Tsai <i>et al.</i> , 1993
<i>Podarcis sicula sicula</i>		S		HyR	Powell <i>et al.</i> , 1986b
<i>Cordylus nigra</i>	CII			HyR	Powell <i>et al.</i> , 1985
<i>Calodactylus</i>	CII			HyR	Powell <i>et al.</i> , 1986b
<i>Thamnophis sirtalis parietalis</i>	CII			HyR	Sherwood <i>et al.</i> , 1988
<i>Tupinambis merinae</i>	CII			HyR	Gonzalez <i>et al.</i> , 1998
<i>Alligator mississippiensis</i>	CII			HyR; P	Lovejoy <i>et al.</i> , 1992; Powell <i>et al.</i> , 1986b
<i>Crocodylus niloticus</i>	CII				
Aves					
<i>Gallus domesticus</i>	CII			P	King & Millar <i>et al.</i> , 1982a;b; Miyamoto <i>et al.</i> , 1984
<i>Struthio camelus</i>	CII			HyR	Powell <i>et al.</i> , 1987
<i>Coturnix coturnix</i>	CII			ICQ	Mikami <i>et al.</i> , 1988
<i>Sturnus vulgaris</i>	CII			HyR	Sherwood <i>et al.</i> , 1988

<i>Melospiza melodia</i>	CI		H y R	Sherwood <i>et al.</i> , 1998
Mammalia				
<i>Tachyloglossus oculatus</i>	CII	M	H y R	King <i>et al.</i> , 1990
<i>Monodelphis domestica</i>	CII	M	H y R	King <i>et al.</i> , 1989
<i>Trichosorus vulpecula</i>	CII	M	H y R	King <i>et al.</i> , 1994
<i>Monodelphis domestica</i>	CII	M	H y R	King <i>et al.</i> , 1990
<i>Suncus murinus</i>	CII	M	H y R; cDNA	Dellovade <i>et al.</i> , 1993
<i>Tupaia glis</i>	CII	M	cDNA	Kasten <i>et al.</i> , 1996
<i>Chrysochloris asiatica</i>	CII	M	H y R	King <i>et al.</i> , 1990
<i>Chaetophractus villosus</i>	CII	M	H y R	Rodríguez Gil <i>et al.</i> en elaboración
<i>Hydrochaeris hydrochaeris</i>	CII	M	H y R	Montaner <i>et al.</i> , 1998
Cerdo		M	P	Matsuo <i>et al.</i> , 1971
Oveja		M	H y R; P	Burgus <i>et al.</i> , 1972; King <i>et al.</i> , 1988
Rata		M	H y R; P	King <i>et al.</i> , 1988; Adelstein <i>et al.</i> , 1986;
				Kelsall <i>et al.</i> , 1990
Ratón		M	P	Mason <i>et al.</i> , 1986
Cobayo		M	H y R; cDNA	Jimenez-Liñan <i>et al.</i> , 1997
Mono	CII	M	H y R	Lescheid <i>et al.</i> , 1997
Humano		M	H y R; P; cDNA	Seeburg & Adelman, 1984; Adelman <i>et al.</i> , 1986;
				King <i>et al.</i> , 1988; White <i>et al.</i> , 1998

Variantes:

CII: chicken GnRH-II; M: mammalian GnRH; CI: chicken GnRH-I; S: salmon GnRH; Sb: Seabream GnRH; Cf: catfish GnRH; H: hearing GnRH; Df: dogfish GnRH; Gp: guinea pig GnRH; Li: lamprey GnRH-I; LIII: lamprey GnRH-III; TI: tunicate GnRH-I; ? : forma no identificada.

Tipo de Identificación:

H y R: HPLC y RIA; P: secuenciación de proteínas; cDNA: secuenciación de cDNA

1. La mayor parte de las especies estudiadas expresan dos o más formas de GnRH.
2. La mayoría de las especies presentan cGnRH-II (Tabla 1-2).

Estas observaciones implicarían que estas variantes se originaron a partir de un fenómeno de duplicación génica y posteriores mutaciones puntuales y que a pesar de que hasta ahora es desconocido, cGnRH-II cumpliría un rol funcional muy importante.

I-Ib El precursor de GnRH

Las distintas variantes de GnRH presentes en los vertebrados, parecen haber evolucionado a partir de cambios producidos en nucleótidos de ADN y no a partir de “splicing” diferenciales del ARN mensajero o de un procesamiento post-traducciona (Sherwood, 1987).

Como otros neuropéptidos, GnRH es producto del clivaje de una molécula precursora de mayor tamaño que es sintetizada a partir de ARN mensajero en el cuerpo neuronal. La estructura del precursor de mGnRH fue descrita por primera vez por Seeburg y Adelman (1984) a partir de placenta humana. La caracterización del gen codificante GnRH en mamíferos (Adelman *et al.*, 1986; Mason *et al.*, 1986); evidenció que la molécula precursora de prepro-GnRH está compuesta por un péptido señal N-terminal, GnRH propiamente dicho, una secuencia de reconocimiento (Gly-Lys-Arg) y por un péptido C-terminal denominado GAP (GnRH-associated peptide) (Figura 1-1).

Esta misma estructura fue posteriormente encontrada en estudios realizados en otros vertebrados no mamíferos. Además de las previamente mencionadas, se conocen las secuencias de ADN codificantes para las prohormonas de: mGnRH en *Xenopus* (Hayes *et al.*, 1994) y en una musaraña (Kasten *et al.*, 1996); sGnRH en diversas especies de teleósteos (Ashishara *et al.*, 1995; Bond *et al.*, 1991; Gothilf *et al.*, 1993, 1995b; 1996; Grober *et al.*, 1992; 1995; Klungland *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1996, Okuzawa *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1992; White *et al.*, 1995), cGnRH-I en gallina (Dunn *et al.*, 1993), cGnRH-II de distintos peces teleósteos (Bogerd *et al.*, 1994; Gothilf *et al.*, 1995b; 1996; White *et al.*, 1994; 1995) y de mamíferos (Kasten *et al.*, 1996; White *et al.*, 1998b), cfGnRH (Bogerd *et al.*, 1994), sbGnRH (Gothilf *et al.*, 1995b; 1996; White *et al.*, 1995), gpGnRH (Jimenez-Liñan *et al.*, 1997).

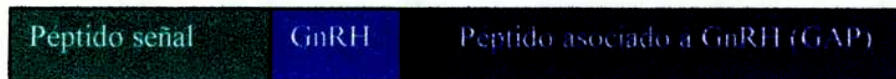


Figura 1-1: Estructura esquemática de la proteína precursora de GnRH, la cual está constituida por un péptido señal hidrofóbico, el péptido GnRH, y el péptido asociado a GnRH (GAP). El segmento de color negro representa el sitio de procesamiento preteolítico consistente en un Gly donador de amida y el sitio de clivaje dibásico Lys-Arg. La longitud del GAP varía de 46 en salmonidos a 56 en mamíferos y gallina.

Todos los genes tienen la misma estructura molecular, compuesta por cuatro exones separados por tres intrones, sugiriendo que todas tienen un origen en común. El primer exón codifica para la región 5' no codificante (5'UTR), el exón II codifica para el péptido señal, el decapeptido GnRH, el sitio de amidación y de clivaje y el extremo N-terminal del GAP. El tercer exón codifica para la región media del GAP, y el exón IV contiene la región C-terminal del GAP y la región 3' no codificante (3'UTR) (King & Millar, 1997).

El primer paso en el procesamiento de la prepro-GnRH es la eliminación del péptido señal hidrofóbico, el cual funciona en la transferencia de la proteína desde las membranas microsomales hacia el Retículo Endoplasmático Rugoso. Este clivaje proteolítico permite que el residuo N-terminal Gln de GnRH pueda ciclarse para formar piro-Glu. El péptido GnRH está conectado en su extremo C-terminal al GAP por una Gly dadora de amida y los residuos Lys y Arg. El procesamiento sigue dentro de los gránulos neurosecretorios donde se almacenan el péptido maduro de GnRH y el GAP (Westel *et al.*, 1991).

La importancia biológica del GAP no está aún claramente definida. Su función sería simplemente permitir que el procesamiento del precursor sea el adecuado (Sherwood *et al.*, 1994). Sin embargo, existen estudios contradictorios que sugieren que tiene acciones inhibitorias en la secreción de PRL y en la secreción de gonadotropinas (Millar *et al.*, 1986; Milton *et al.*, 1986; Nickolis *et al.*, 1985, Thomas *et al.*, 1988).

La similitud en la organización general entre los diferentes genes de GnRH sugiere que derivan de un precursor ancestral común. Es posible que el gen haya sufrido una duplicación génica dando origen a nuevas formas de GnRH.

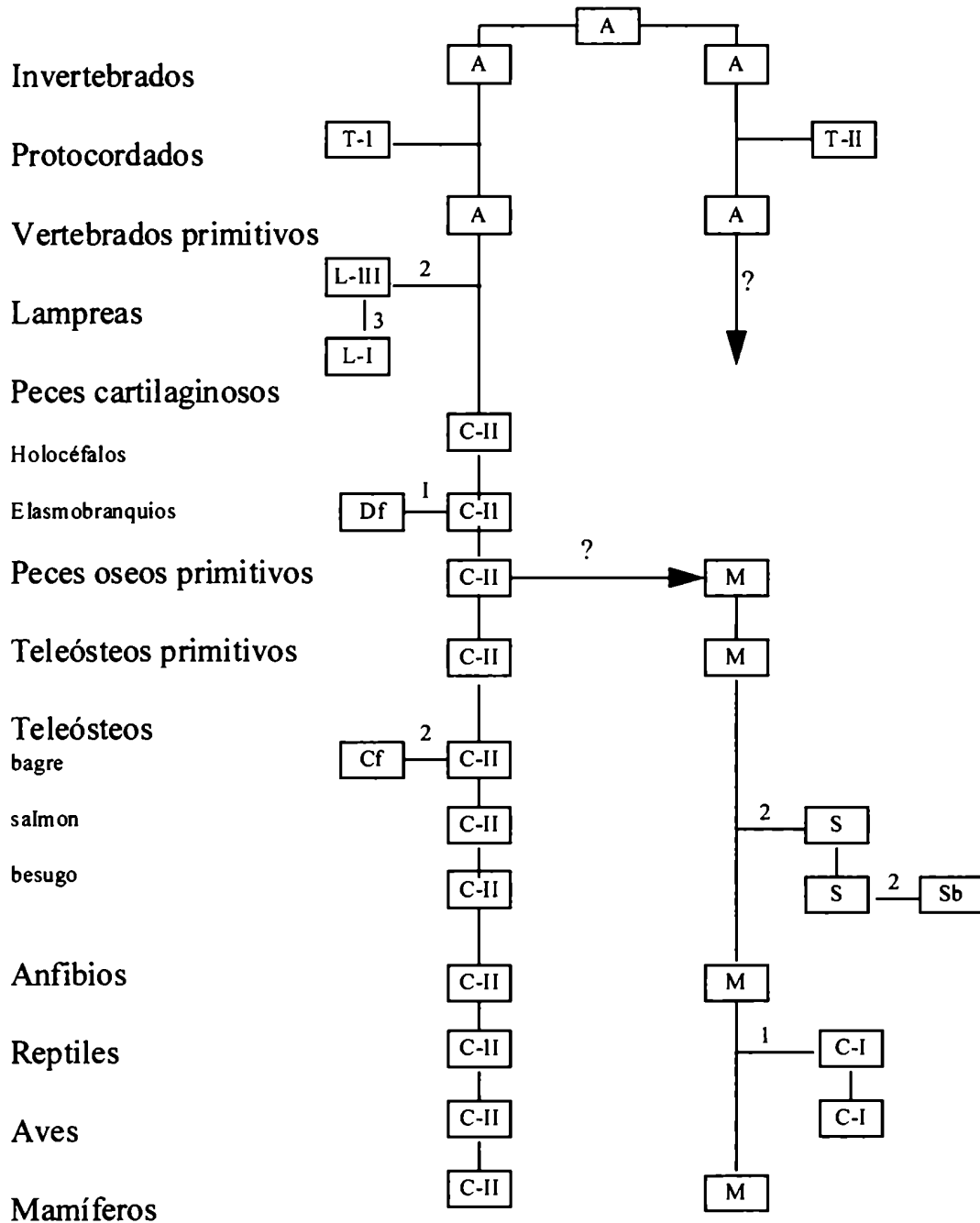
I-I-c Historia evolutiva de GnRH

Basados en la secuencia aminoacídica de GnRH, diversos autores propusieron distintos esquemas hipotéticos de la evolución de variantes conocidas de esta molécula. Como es lógico pensar, a medida que se identificaban secuencias nuevas, estos esquemas fueron modificados (King & Millar, 1995; Lin *et al.*; 1998; Sherwood *et al.*, 1997; Sower *et al.*, 1993). Básicamente estos esquemas filogenéticos se construyeron a partir de la distribución taxonómica de las moléculas en correlación con los posibles cambios aminoacídicos de cada una de las variantes conocidas de GnRH.

Todos los esquemas coincidieron en la idea de la existencia de una molécula ancestral a partir de la cual, por duplicación génica se originaron dos ramas que, a través de mutaciones originaron más variantes. En este sentido hoy se asume que dos fenómenos de duplicación del genoma entero ocurrieron en los estadios tempranos de la evolución de los vertebrados, entre los protocordados y los peces óseos ancestrales. Una tercer duplicación puede haber ocurrido temprano en la evolución de los peces teleósteos (Amores *et al.*, 1998). Luego de este fenómeno los loci duplicados divergieron independientemente de manera que el hipotético vertebrado ancestral era funcionalmente diploide (Ohno, 1970). Los loci duplicados pueden haber continuado expresándose por años y uno de ellos pudo haber continuado acumulando mutaciones puntuales mientras una de las copias mantuviera sus funciones biológicas (Larhammar & Risinger, 1994). Distintas familias de neuropéptidos se han originado a partir duplicaciones de genes individuales o de duplicación de genoma en su totalidad (tetraploidía) y una subsecuente acumulación de mutaciones puntuales (Ohta, 1991).

En la Figura 1-2 se representa uno de los esquemas evolutivos propuestos (Sherwood *et al.*, 1997).

Figura 1-2: Esquema hipotético acerca de la evolución de once de las trece variantes conocidas de GnRH a partir de una molécula ancestral (A). Los números indican las diferencias de los aminoácidos entre dos formas de GnRH. Las formas de GnRH se indican como: A, ancestral; C-I, chicken I; C-II, chicken-II; Cf, catfish; Df, dogfish; L-I, lamprea-I; L-III, lamprea-III; M, mamífero; S, salmón; Sb, seabream; T-I, tunicado-I; T-II, tunicado-II. Este esquema es una versión adaptada de Sherwood N.M. *et al.*, 1997a. Cabe resaltar que este esquema no incluye las variantes Guinea pig y hearning GnRH.



Sin embargo, este tipo de estudios son insuficientes para determinar la historia evolutiva de GnRH dado que no se puede obtener demasiada información filogenética a partir de 10 caracteres de los cuales sólo 4 están conservados (Grover, *et al.*, 1995; Dores *et al.*, 1996). La molécula precursora de cada decapeptido deducida de la secuencia del ADN copia (cDNA) puede resultar muy útil en la confección del mapa evolutivo.

Para los análisis de parsinomia fue necesario acumular datos acerca de la secuencia del cDNA de la preprohormona de diversas especies de vertebrados. Basados en este análisis, White, *et al.* (1998b), han diseñado un árbol filogenético (Fig 1-3), demostrando la existencia de tres grupos evolutivos de GnRH divididos por su localización neuroanatómica: el grupo de formas localizadas en áreas hipotalámicas, relacionadas con la liberación de gonadotrofinas (grupo GnRH-I), formas localizadas en el núcleo del cerebro medio (grupo GnRH-II), y formas localizadas en el telencéfalo en diversas especies de peces (grupo GnRH-III).

A pesar de que estas relaciones filogenéticas no puedan explicar las fuerzas evolutivas involucradas en la aparición de diversas formas de GnRH, este análisis puede sugerir el momento de aparición de las mismas. Este árbol filogenético, explica que la presencia de más de una variante en una misma especie se debe a una duplicación ancestral del gen codificante para GnRH. Además, parecería que la distintas formas divergieron una de otra antes de la divergencia de las especies representadas en el árbol. Como el árbol no tiene raíces, el orden exacto de la aparición de la duplicación génica se desconoce. Sin embargo, los grupos GnRH-I y GnRH-II incluyen representantes desde los peces hasta los mamíferos, entonces la separación de estos grupos debería haber ocurrido antes de la radiación de los ancestros de mamíferos y peces. El origen del grupo GnRH-III parece más confuso, porque existen sólo representantes de peces en este grupo, pero dos hipótesis pueden originarse de este estudio. Primero, es posible que la duplicación génica que dio origen al grupo GnRH-III ocurrió recientemente, dentro del linaje de los peces, y por lo tanto se restrinja a este taxón. Alternativamente, el grupo GnRH-III puede haber surgido de una duplicación ancestral, pero existe la posibilidad de que en los vertebrados superiores haya desaparecido o que todavía no hayan sido detectadas.

Sólo GnRH-II es idéntica en todas las especies donde ha sido detectada. Esto sugiere que las presiones selectivas han sido muy fuertes para GnRH-II. Tal tipo de selección podría explicarse con el hecho de que GnRH-II tenga múltiples funciones,

dado que se ha demostrado su presencia en tejidos extra cerebrales (White *et al.*, 1998b).

Fig 1-3: Arbol filogenético de GnRH. El árbol fue contruido en base a la comparación de las preprohormonas de GnRH. Las distancias evolutivas, se representan por la longitud de las ramas. Los números que aparecen en los nodos indican el número de veces en las cuales las secuencias se agrupan de una determinada manera en un test de robustez (White *et al.*, 1998b).

I-Id Funciones de GnRH

La función más conocida de GnRH es la activación de la síntesis y liberación de las gonadotrofinas adenohipofisarias. En los distintos grupos de vertebrados, las neuronas inmunoreactivas a mGnRH, cGnRH-I, sGnRH, cfGnRH o sbGnRH se localizan en el sistema anterior y sus axones llegan a los vasos del sistema portal hipotálamo-hipófisis en los tetrápodos o directamente a la hipófisis en los peces teleósteos. Esta distribución neuroanatómica, implicaría que estos neuropéptidos estarían involucrados principalmente en el control reproductivo a través de la liberación de las gonadotrofinas. Los peces teleósteos presentan una particularidad, dado que las fibras que contienen GnRH alcanzan directamente la glándula hipófisis, la o las variantes presente en esta glándula actuarían como factores liberadores de las gonadotrofinas.

Además de estimular la liberación de gonadotrofinas, GnRH estimula, en algunos peces teleósteos, la liberación de la hormona de crecimiento (GH) (Marchant *et al.*, 1989b; Melamed *et al.*, 1995), de prolactina (PRL) (Weber *et al.*, 1997) y de somatolactina (SL) (Kakisawa *et al.*, 1997). No es difícil pensar que GnRH estimule la liberación de estas hormonas hipofisarias, dado que GH, PRL y SL pertenecen a la misma familia de hormonas proteicas que derivan de una gen ancestral común.

Fuera del sistema nervioso central, GnRH tiene efectos parácrinos sobre las gónadas, donde afecta la síntesis de hormonas esteroideas, y en la placenta donde estimula la secreción de la hormona gonadotrofina coriónica (Hsueh & Shaeffer., 1985). Recientemente, existían sólo algunos datos preliminares en vertebrados inferiores, acerca de la expresión de este péptido en las gónadas (Sherwood *et al.*, 1997), sin embargo recientemente Pati y Habibi (1998) identificaron sGnRH por análisis de su secuencia en ovario de goldfish.

Además se ha demostrado la presencia de sitios de unión a GnRH en ovario de goldfish, carpa y bagre (Habibi & Pati, 1993, b; Habibi *et al.*, 1994; Pati & Habibi, 1992; 1993a,b) así como en testículos de varias especies de anfibios (Chieffi, *et al.*, 1991). Recientemente, se ha detectado ARN mensajero en las gónadas de un pez del superorden Paracanthopterygii, *Porichthy notatus* (Grober *et al.*, 1995) y de ovario de goldfish *Carassius auratus* (Lin *et al.*, 1996) demostrando expresión gonadal de variantes de GnRH.

I-II Objetivo

Dado que la hormona liberadora de gonadotrofinas es un importante mediador en el control neuronal de la reproducción en los peces, como estimulador de la secreción de las gonadotrofinas hipofisiarias (GtHs), nuestro objetivo fue identificar las variantes moleculares de GnRH que se expresan en cerebro e hipófisis de pejerrey a través de un estudio indirecto que combina HPLC y RIA con antisueros específicos. Este estudio permitirá determinar cuál de las variantes estaría involucrada en la regulación de gonadotrofinas. Por otro lado, se analizará si algunas de estas variantes también se expresan en las gónadas.

I-III Material y Métodos

I-IIIa Animales

Se utilizaron ejemplares adultos de ambos sexos capturados principalmente en el período reproductivo primaveral en la Laguna Salada Grande (Partido de Madariaga, Prov. de Buenos Aires), con la ayuda del personal del Instituto Nacional de Desarrollo Pesquero (INIDEP) dirigido por el Lic. Alberto Espinach y la autorización de la Dirección de Desarrollo Pesquero del Ministerio de Asuntos Agrarios de la Provincia de Buenos Aires. Los peces fueron capturados con redes agalleras y se sacrificaron inmediatamente por decapitación, para la extracción de cerebros, gónadas e hipófisis. Estos tejidos se congelaron inmediatamente en hielo seco, se transportaron al laboratorio y se almacenaron a -70°C hasta posterior tratamiento.

La cantidad de tejido y animales utilizada en cada experimento fue:

Experimento 1: 10 g. de tejido, aproximadamente 20 cerebros.

Experimento 2: 25 g. de tejido, aproximadamente 50 cerebros.

Experimento 3: 5 g. de tejido, aproximadamente 10 cerebros.

Experimento 4: 13 g. de tejido, aproximadamente 26 cerebros.

Experimento 5: 660 mg. de tejido, aproximadamente 200 hipófisis.

Experimento 6: 230 g. de tejido, aproximadamente 12 ovarios y 45 g. de tejido, aproximadamente 10 testículos.

I-IIIb Extracción de péptidos

Para la extracción de péptidos, se utilizó una adaptación del método de Sherwood *et al.* (1984). El tejido fue homogenizado con homogeneizador del tipo Ultraturrax en Acetona:HCl 1N (100:3, V/V), 10 ml. por cada 2 g. de tejido, con un volumen mínimo de extracción de 10ml. Se extrajo bajo agitación constante a 4°C durante 3 hs. y se filtró con papel Whatman N°1. El material insoluble se re-extrajo con Acetona:HCl 0.01N (80/20, V/V) en dos quintos del volumen del fluido original de extracción. Se mantuvo con agitación a 4 °C durante 5 min. y se volvió a filtrar. Los filtrados combinados fueron entonces extraídos con éter de petróleo (bp 30-60 °C) para remover la acetona, lípidos y otras sustancias hidrofóbicas. La relación del filtrado y el éter de petróleo se mantuvo en 4:1 (V/V) por cada una de las cinco extracciones. La fase acuosa final fue concentrada en un evaporador rotatorio hasta un volumen final de 1ml.

I-IIIc Cromatografía líquida de alta presión, fase reversa (RP-HPLC)

Previo a la separación cromatográfica, cada extracto fue filtrado por un filtro Millipore HA 0.45 µm. e inyectado a través de un loop de inyección de 1ml a una columna Lichospher Merck (4 x 250 mm., 5 µm.), unida a una pre-columna del mismo material. El flujo de la cromatografía fue ajustado en 1ml./min. El programa comenzó con 10 min. de corrida isocrática de 17% de Acetonitrilo en TEAF (Formiato de trietilamina 0.25M, pH 6.5). Luego la concentración de Acetonitrilo se aumentó linealmente a 24% durante un período de 7 min. y este porcentaje se mantuvo constante hasta el final de la cromatografía. En cada cromatografía se recolectaron 70 fracciones de 1ml las cuales fueron liofilizadas.

Las fracciones fueron resuspendidas en 1ml de buffer de radioinmunoensayo (Buffer RIA) para la determinación de inmunorreactividad a GnRH (ir-GnRH) por RIA en alícuotas de 100ul.

La inyección cada extracto fue precedida por una corrida blanco que fue analizada de la misma manera que la cromatografía de los extractos de tejido con el

objeto de descartar posible contaminación de la columna y/o el sistema de inyección y conexiones. Para la realización de esta cromatografía se inyectó 1ml de fase móvil.

La posición de elución de las variantes moleculares sintéticas de GnRH (cfGnRH, mGnRH, lGnRH-I, cGnRH-I, cGnRH-II, sGnRH, dfGnRH) fue determinada por absorción a 280nm. Según el caso se mezclaron 200 ng. de cada uno de los estándares en TEAF-Acetonitrilo 17%. en un volumen final de 1ml. La mezcla se inyectó y cromatografió en las mismas condiciones que los extractos de tejido.

En el caso del Experimento 3, el extracto cerebral se dividió en dos fracciones. La primera fracción fue cromatografiada como se describió previamente. A la segunda fracción se le agregó las formas sintéticas cGnRH-II y sGnRH (3 ng. de cada una) y se cromatografió en las mismas condiciones. La cromatografía de cada fracción del extracto fue precedida por una corrida blanco en la cual se inyectó solamente TEAF. Luego de la segunda cromatografía se inyectaron las formas sintéticas como se describió previamente.

Todas las formas sintéticas de GnRH (excepto cfGnRH, dfGnRH, lGnRH-III y sbGnRH) se obtuvieron del Laboratorio Península (Belmont, CA); cfGnRH fue provisto generosamente por Dr. R. Schulz (University of Utrecht, The Netherlands) mientras que dfGnRH, lGnRH-III y sbGnRH fueron gentilmente cedidos por Dr. J. Rivier, The Clayton Foundation. En los epígrafes de las figuras se indican los tiempos de elución de cada una de las variantes sintéticas de GnRH.

I-III-d Radioinmunoensayo

Radioiodinación: Se radioiodinaron las siguientes variantes moleculares de GnRH: cGnRH-II, mGnRH, sGnRH, según el protocolo de Yu *et al.*, (1987) con algunas modificaciones realizadas por nuestro laboratorio (Somoza *et al.*, 1994; 1996).

El protocolo general de marcación consistió en añadir 0.5-1mCi de ^{125}I (llevado a 10 μl . con buffer fosfato 0.5M) a 5 μg . de GnRH diluido en 10 μl . de ácido acético 0.1N. La reacción comenzó con el agregado de Cloramina T (10 μg . en 10 μl . en buffer fosfato 0.05M pH 7.5). El tiempo de reacción varió de acuerdo al estándar (mGnRH 40 segundos, las restantes variantes 2 min.) y la misma se detuvo diluyendo con Acetato de Amonio 2mM). Para la separación del péptido marcado y del ^{125}I libre, el producto de la reacción se sembró en una columna de carboximetilcelulosa (aproximadamente 6 X 0.6

A/S	Dilución	GnRH- I ¹²⁵	GnRH estándar	mGnRH	CGnRH-I	CGnRH-II	sGnRH	LIGnRH	cfGnRH	dfGnRH	LIIIGnRH
cII678	1:40000	mGnRH	mGnRH	100	416	81	437	3	18	36	nd*
PBL-45	1:150000	sGnRH	sGnRH	100	133.3	25.9	100	24	nd*	1.58**	nd*
PBL-49	1:250000	sGnRH	sGnRH	93.3	333.3	32.6	100	2	nd*	4.59**	nd*
SGnRH#2	1:300000	sGnRH	sGnRH	< 0.01	< 0.01	1.58	100	0.08	nd*	398**	nd*
cII675	1:10000	CGnRH-II	CGnRH-II	< 0.01	< 0.01	100	< 0.01	< 0.01	nd*	nd*	nd*
s1668	1:10000	sGnRH	sGnRH	< 0.01	< 0.01	0.7	100	0.4	nd*	nd*	nd*

Tabla 1-3: Porcentaje de reactividad cruzada calculada a partir de la masa del análogo necesaria para inhibir la unión de GnRH ionizado al antisuero en un 50% en radioinmunoensayos homólogos.

cm) equilibrada en acetato de amonio 2mM, pH 4.5. En estas condiciones se recogieron cinco fracciones de aproximadamente 3ml. A partir de la sexta fracción, se aumentó la fuerza iónica del solvente de elución utilizando acetato de amonio 200mM, pH 4.5 (salvo en el caso de sGnRH que se eluyó con acetato de amonio 100mM). Todas las fracciones se recogieron en 300 µl. de acetato de amonio 2mM, BSA 5% y se llevaron a 3 ml. de volumen final.

Antisueros: Se utilizaron los siguientes antisueros:

cII678 (elevado en conejo contra cGnRH-II), cII675 (elevado en conejo contra cGnRH-II), s1668 (elevado en conejo contra sGnRH), gentilmente cedidos por la Dra. J.A. King, Dept. of Chemical Pathology. Medical School. University of Cape Town. Sud Africa.

PBL#45 (elevado en conejo contra Lys[8]GnRH), PBL#49 (elevado en conejo contra sGnRH), gentilmente cedidos por el Dr. W. Vale, The Salk Institute, The Clayton Foundation Laboratories for the Peptide Biology USA.

sGnRH#2 (elevado en conejo contra sGnRH), provisto por Dr. K. Aida, Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Japón.

Los antisueros cII678, PBL#45 y PBL#49 se utilizaron como primer sistema de detección. Los restantes antisueros fueron utilizados en los ensayos de alta especificidad. Ver Tabla 1-3 con respecto a las características de cada sistema de RIA y el porcentaje de reactividad cruzada contra los diferentes estándares sintéticos.

La linealización de la curva B/Bo en función de la concentración del estándar GnRH se obtuvo con la transformación Logit (B/Bo) y el logaritmo natural para la concentración.

Estadística: Las pendientes de la linealización de las curvas de desplazamiento, b_1 y b_2 se compararon utilizando la siguiente estadística:

$$F = \frac{(b_1 - b_2)^2}{\frac{(SC_{\infty})_1 + (SC_{\infty})_2 \cdot s^2}{(SC_{\infty})_1 \cdot (SC_{\infty})_2}}$$

$$\text{donde } s^2 = \frac{(SC_{\text{error}})_1 + (SC_{\text{error}})_2}{n_1 + n_2 - 4}$$

El test asume la homogeneidad de las varianzas de las funciones lineales a comparar. En este caso, b_1 representa la pendiente de la muestra incógnita y b_2 la pendiente que se obtiene con el estándar sintético. Las diferencias se consideran significativas cuando $p < 0.05$.

I-IV Resultados

En este estudio se analizó la posición de elución de nueve de las variantes de GnRH conocidas. Utilizando este sistema, se encontró una separación de 43 minutos entre las dos formas más hidrofílicas (cfGnRH y lGnRH-III) y de la variante más hidrofóbica (sGnRH).

cfGnRH y lGnRH-III coeluyen en las fracciones 17-18, mGnRH eluye junto a lGnRH-I en las fracciones 20-21, cGnRH-I y sbGnRH en la fracción 22, cGnRH-II entre las fracciones 25 y 29, dfGnRH en las fracciones 34-37, y sGnRH en las fracciones 58-64 dependiendo de la cromatografía.

Experimento 1

El primer análisis por RIA del extracto cerebral de pejerrey fue realizado con los sistemas de RIA cII678, PBL#45 y PBL#49, considerando la reactividad cruzada de estos sistemas contra las distintas formas de GnRH.

Todos estos sistemas de RIA revelaron la presencia de tres picos inmunoreactivos a GnRH (ir-GnRH) (Figuras 1-4a, 1-4b y 1-4c). El primer pico ir-GnRH correspondiente a las fracciones 26-29, eluye como cGnRH-II. Estas fracciones fueron mezcladas en un tubo y analizadas en un sistema de RIA específico para cGnRH-II (cII675). El desplazamiento obtenido a partir de las diluciones seriadas no fue estadísticamente diferente al obtenido con cGnRH-II sintético (Figura 1-5a).

El segundo pico inmunoreactivo (fracciones 34-35) no eluyó en la posición de ninguno de los estándares utilizados en este primer experimento.

Por último, el tercer pico ir-GnRH eluyó como sGnRH (fracciones 58-67). El desplazamiento obtenido a partir de las diluciones seriadas no fue estadísticamente diferente al obtenido con sGnRH (Figura 1-5b) utilizando sGnRH como trazador y sGnRH#2 como antisuero.

Experimento 2

Para analizar más profundamente la reactividad cruzada del segundo pico ir-GnRH, se utilizaron otros sistemas de RIA. El primer análisis fue realizado con el sistema de RIA cII678, y como era de esperar, se reveló la presencia de tres picos ir-GnRH (datos no mostrados). Nuevamente, el primer pico ir-GnRH (fracciones 25-26) eluyó en la misma posición que cII678 y se comportó como tal en ensayos en sistemas homólogos (Figura 1-6a).

El segundo pico ir-GnRH (fracciones 29-31), no muestra estadísticamente disparelismo a la curva de desplazamiento de la forma sintética de cGnRH-II en un ensayo homólogo utilizando el antisuero cII675 (Figura 1-6b). Sin embargo no muestra reactividad cruzada en ensayos homólogos para sGnRH (sistema sGnRH#2, datos no mostrados).

El tercer pico ir-GnRH (fracciones 50-56) eluyó en la misma posición que sGnRH. En el estudio de paralelismo las pendientes de ambas curvas no difieren significativamente en dos ensayos homólogos con los antisueros sI668 (Figura 1-6c) y sGnRH#2 (Figura 1-6d).

Experimento 3

Otra forma de determinar la naturaleza de los picos ir-GnRH uno y tres consiste en realizar un estudio co-cromatográfico agregando cGnRH-II y sGnRH externos al extracto cerebral y compararlo con la cromatografía del extracto cerebral sin el agregado de estándares externos. El análisis por RIA de las fracciones de RP-HPLC (extracto cerebral y extracto cerebral más estándares sintéticos) fueron analizados con el antisuero PBL#49.

Como era de esperar, este ensayo reveló la presencia de tres picos ir-GnRH: el primer pico ir-GnRH fracciones 28-30, el segundo pico, fracciones 32-36, y el tercer pico, fracciones 50-57 en ambas cromatografías (Figura 1-7), observándose un aumento

relativo del área correspondiente al primer y tercer pico en la cromatografía con los estándares externos.

Con el fin de cuantificar la masa de cII GnRH y sGnRH, se realizaron radioinmunoanálisis homólogos para ambas variantes. Aquellas fracciones con ir-GnRH a cGnRH-II y sGnRH fueron mezcladas independientemente (tanto en la cromatografía como en la co-cromatografía). El primer pico, fue analizado con un RIA homólogo para cGnRH-II (antisuero cII675). Se detectaron 1.08ng en el caso del extracto cerebral, y 3.86ng en el caso de la co-cromatografía, con una diferencia de 2.78ng. El mismo análisis fue realizado con el tercer pico, en este caso con dos sistemas de RIA. En el ensayo con el antisuero s1668, se detectó 1.16ng en el control y 4.14ng en las fracciones correspondientes al extracto cerebral más sGnRH sintético (diferencia de 2.78ng). En el ensayo con el sistema RIA sGnRH#2 se obtuvieron los siguientes resultados: 0.8ng en la cromatografía control y 3.86ng en las fracciones correspondientes a la co-cromatografía (diferencia de 3.03ng). En ambos casos la diferencia fue coincidente con la cantidad de estándar agregado.

Es importante recalcar, que el área bajo la curva en el caso del segundo pico ir-GnRH no se observaron diferencias entre la cromatografía control y la de la co-cromatografía en el análisis realizado con el sistema RIA con el antisuero PBL#49.

Experimento 4

En experimentos preliminares, se determinó que la posición de elución de dfGnRH era muy próxima a la del segundo pico ir-GnRH, de manera que este estándar se incluyó como control.

En este experimento, dfGnRH eluyó en las fracción 34, mientras que el segundo pico ir-GnRH lo hizo entre las fracciones 31-32 (RIA realizado con el antisuero cII678, datos no mostrados).

A pesar de que en principio estos dos péptidos no eluyeron en la misma posición se quiso profundizar en el estudio de la naturaleza de este péptido. Como no contamos con antisueros elevados contra dfGnRH, se realizó un estudio de paralelismo en un sistema heterólogo con sGnRH como trazador y el antisuero sGnRH#2 que tiene alta reactividad cruzada con dfGnRH (398%).

En este caso, las diluciones seriadas de las fracciones correspondientes al segundo pico ir-GnRH no desplazó la unión del trazador sGnRH con sGnRH#2,

Figura 1-4: Corrida de HPLC de extracto cerebral inmunodetectado con: a) antisuero cII678; b) antisuero PBL #49; c)PBL#45. Las flechas indican la posición de elución de las variantes sintéticas de GnRH cromatografiadas. La primer flecha a la izquierda indica el tiempo de elución de LIgNnRH y mGnRH, la segunda flecha indica cIGnRH junto con sbGnRH, la tercer flecha indica cIIGnRH y la última sGnRH.

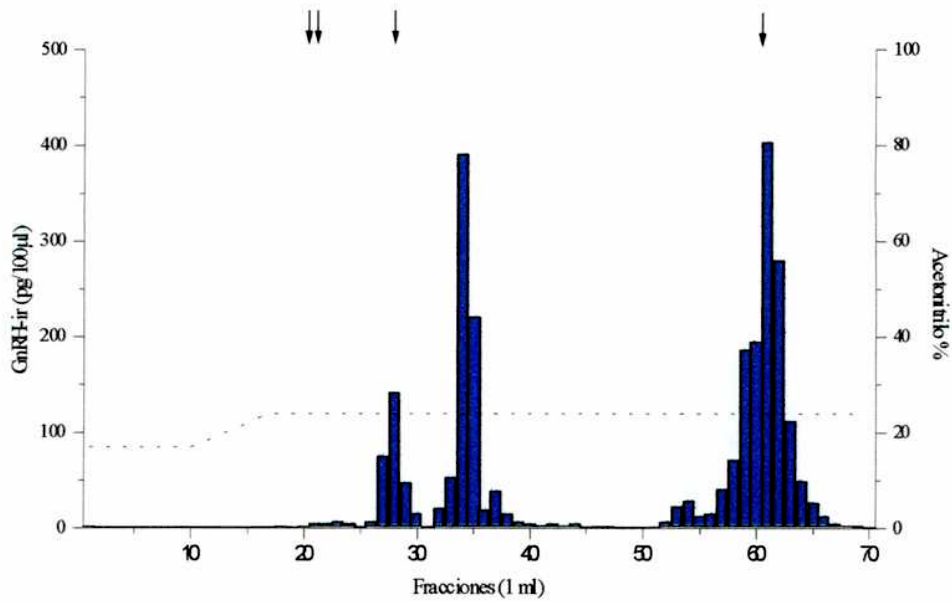


Figura 1-4a: Antisero cII678

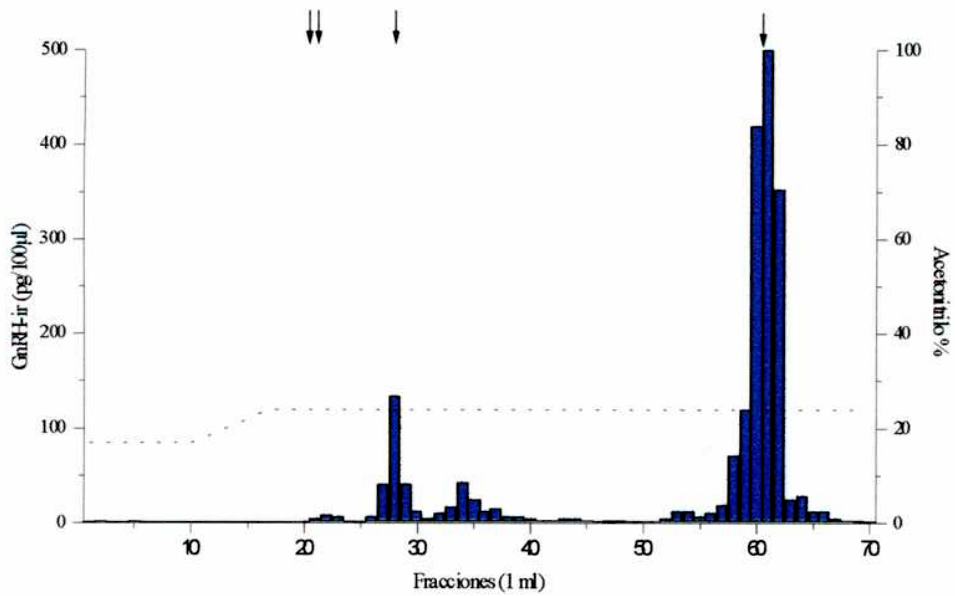


Figura 1-4b: Antisero PBL#49

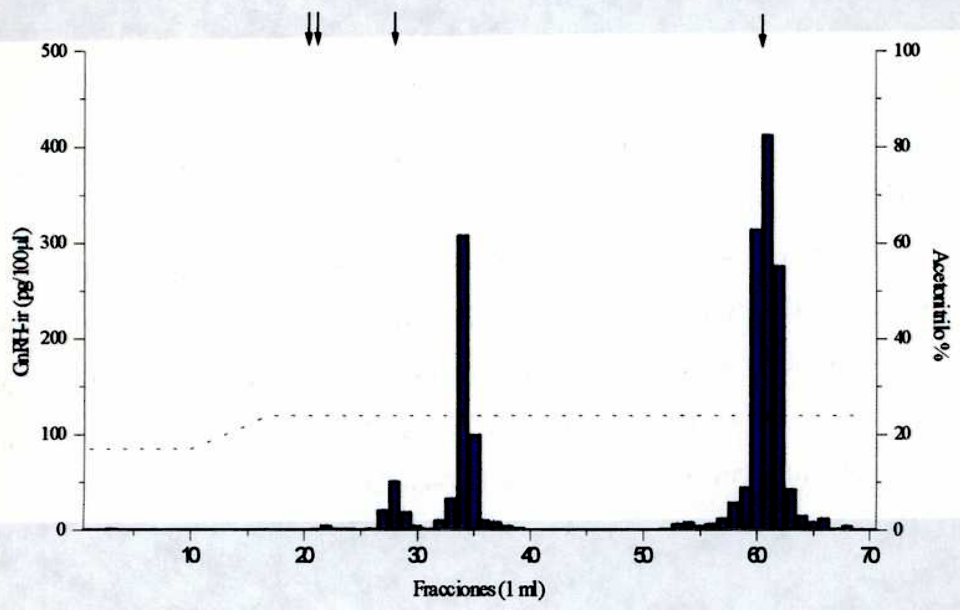


Figura 1-4c: Antisero PBL#45

Figura 1-5: a) Paralelismo de diluciones seriadas de las fracciones 26-29 (□) de la cromatografía del extracto cerebral , con respecto a cII GnRH sintético (■), utilizando el antisuero cII675. La pendiente de la curva no fue significativamente diferente al estándar sintético cII GnRH. b) Paralelismo de diluciones seriadas de las fracciones 58-67 (□) de la cromatografía del extracto cerebral , con respecto a sGnRH sintético (■), utilizando el antisuero sGnRH#2. La pendiente de la curva no fue significativamente diferente al estándar sintético sGnRH.

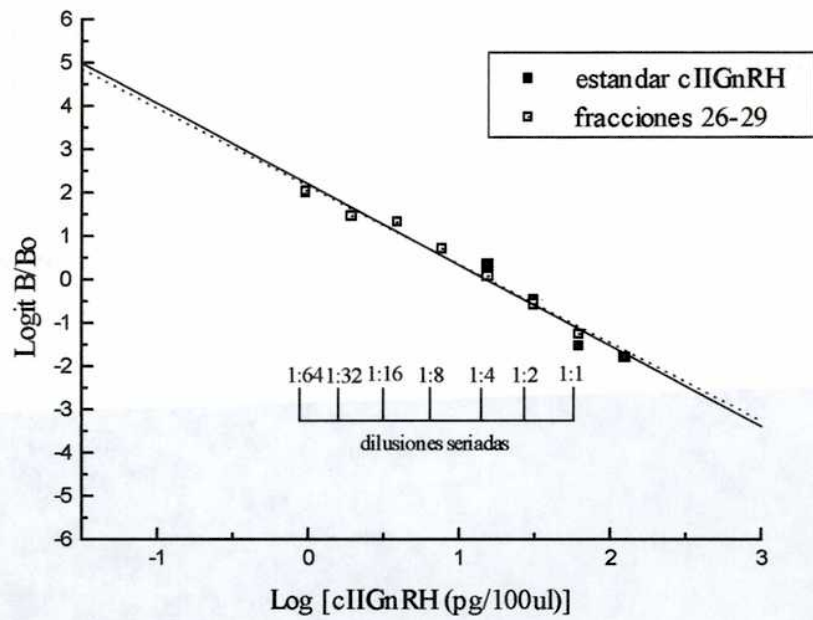


Figura 1-5a: Antisuero cII675

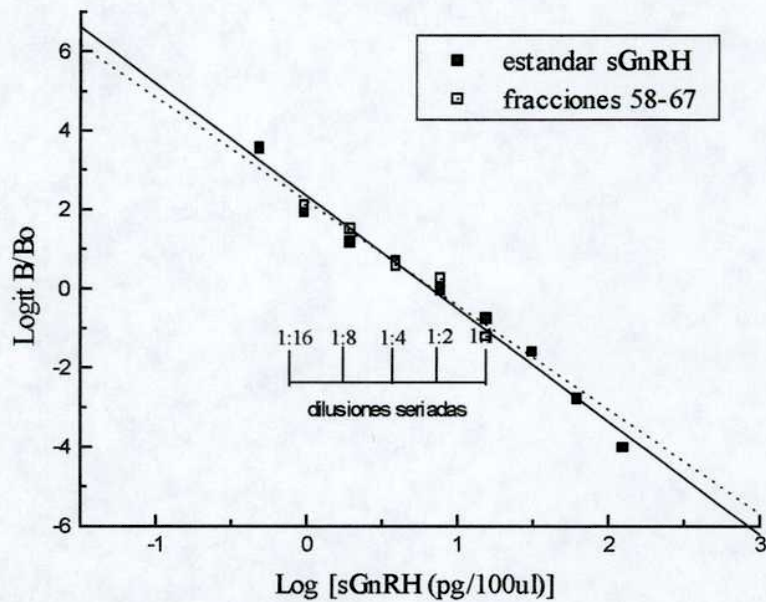


Figura 1-5b: Antisuero sGnRH#2

Figura 1-6: a) Paralelismo de diluciones seriadas de las fracciones 25-26 (□) de la cromatografía del extracto cerebral , con respecto a cII GnRH sintético (■), utilizando el antisuero cII675. La pendiente de la curva no fue significativamente diferente al estándar sintético cII GnRH. b) Paralelismo de diluciones seriadas de las fracciones 29-31 (□) de la cromatografía del extracto cerebral , con respecto a cII GnRH sintético (■), utilizando el antisuero cII675. La pendiente de la curva no fue significativamente diferente al estándar sintético cII GnRH c) Paralelismo de diluciones seriadas de las fracciones 50-56 (□) de la cromatografía del extracto cerebral , con respecto a sGnRH sintético (■), utilizando el antisuero s1668. La pendiente de la curva no fue significativamente diferente al estándar sintético sGnRH. d) Idem c) pero con el antisuero sGnRH#2. La pendiente de la curva no fue significativamente diferente al estándar sintético sGnRH.

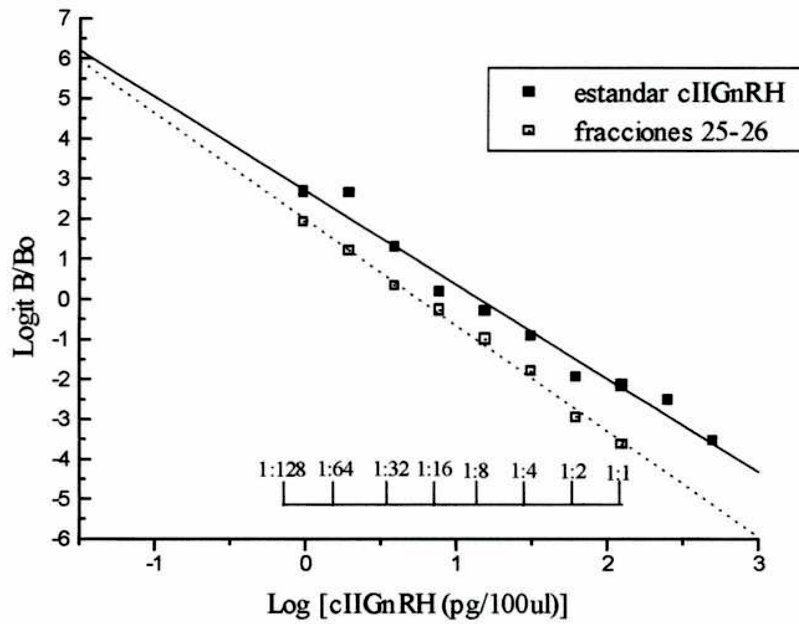


Figura 1-6a: Antisuero cII675

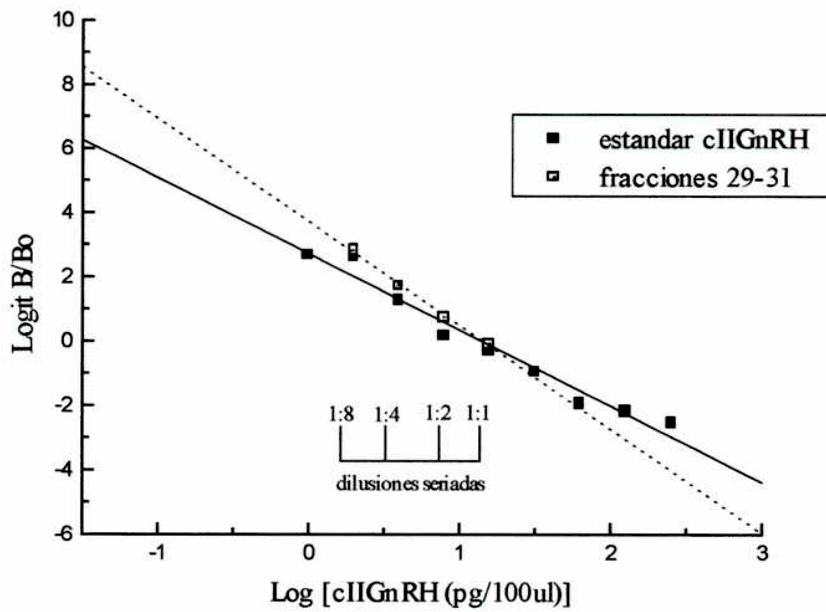


Figura 1-6b: Antisuero cII675

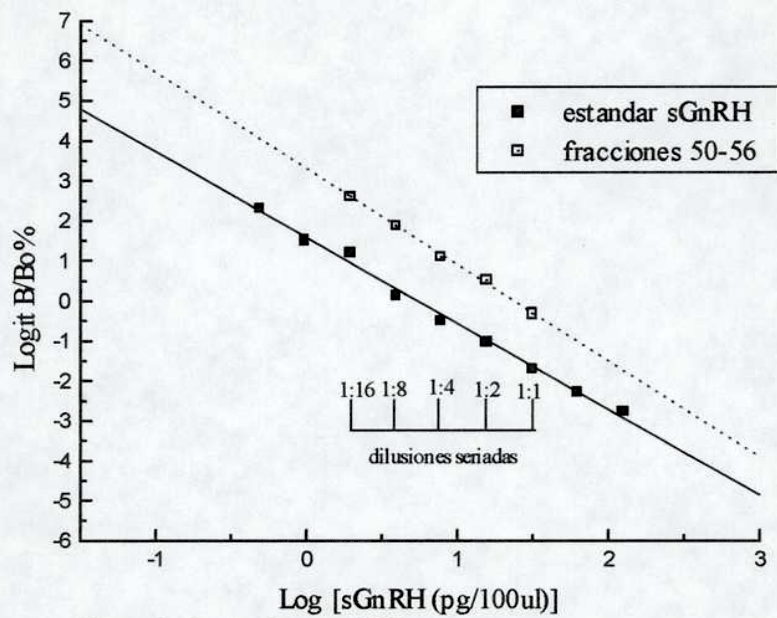


Figura 1-6c: Antisuero s1668

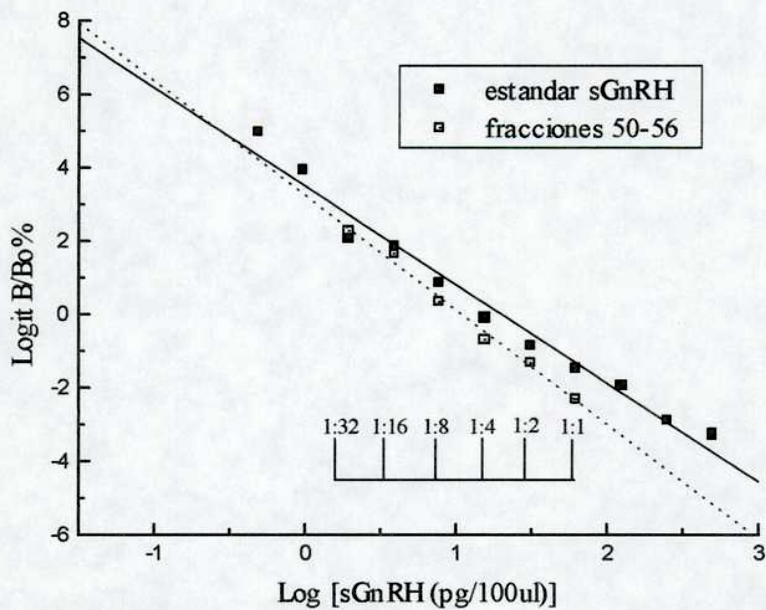


Figura 1-6d: Antisuero sGnRH#2

Figura 1-7: HPLC de extracto cerebral (barras azules) y co-cromatografía de extracto cerebral más estándares sintéticos cIIGnRH y sGnRH (barras blancas) ensayadas con el antisuero PBL#49. Mirar Figura 1-4 por las referencias.

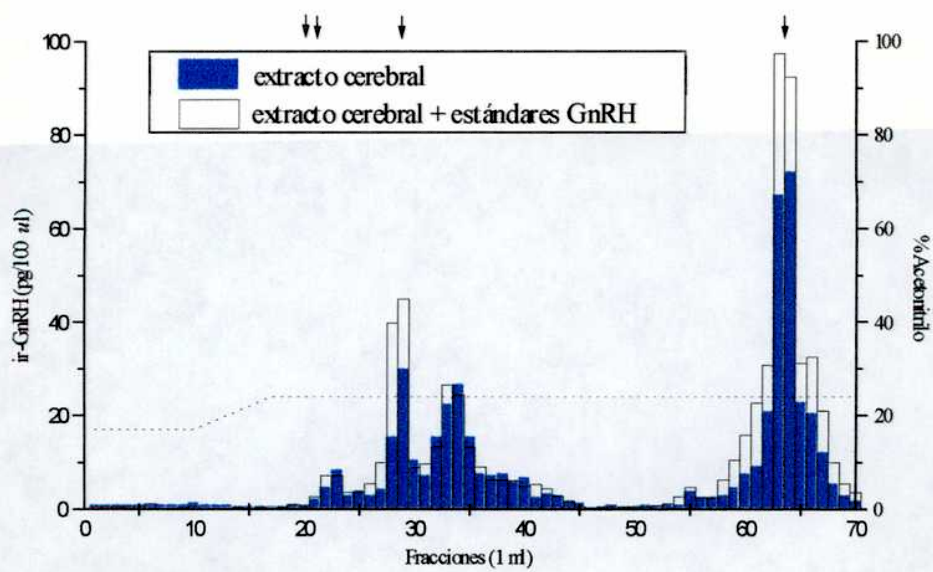


Figura 1-7: Antisuero PBL#49

Figura 1-9: Corrida de HPLC de extracto hipofisiario inmunodetectado con: a) antisuero cII678; b) antisuero PBL #49; c)PBL#45. Las flechas indican la posición de elución de las variantes sintéticas de GnRH cromatografiadas. La primer flecha a la izquierda indica el tiempo de elución de LIGnRH y mGnRH, la segunda flecha indica cIGnRH, la tercer flecha indica cIIGnRH, la cuarta flecha indica dfGnRH y la última sGnRH.

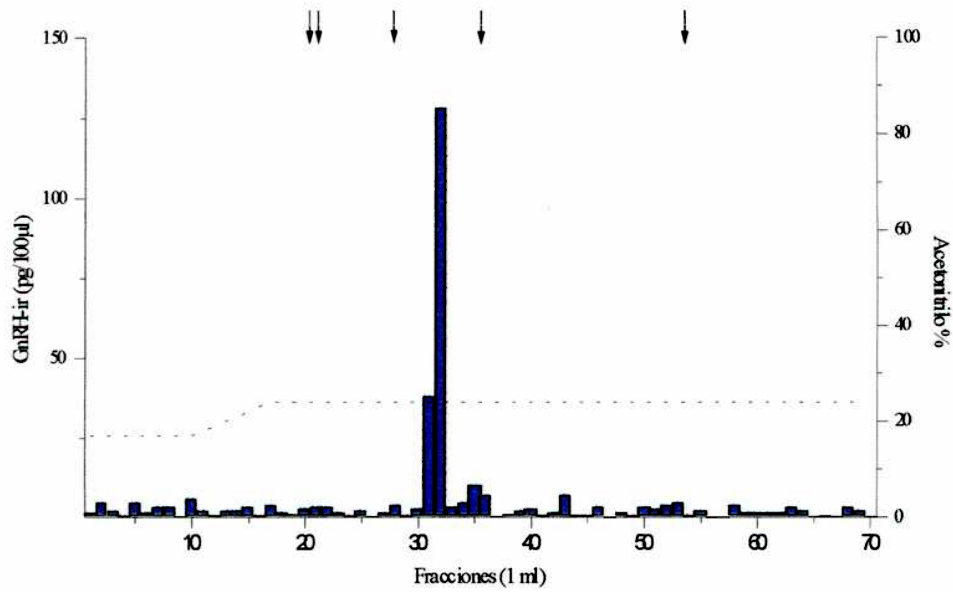


Figura 1-8a: Antisero cII678

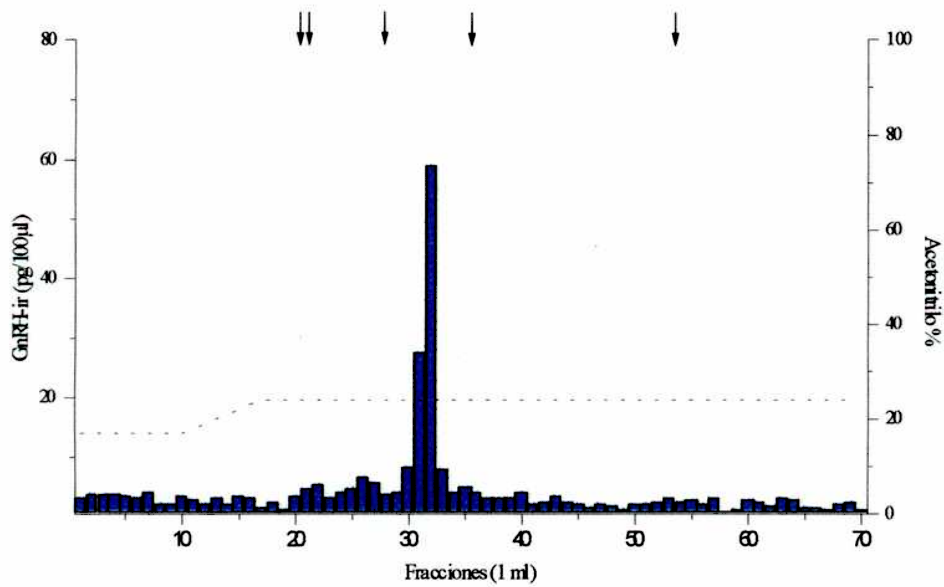


Figura 1-8b: Antisero PBL#49

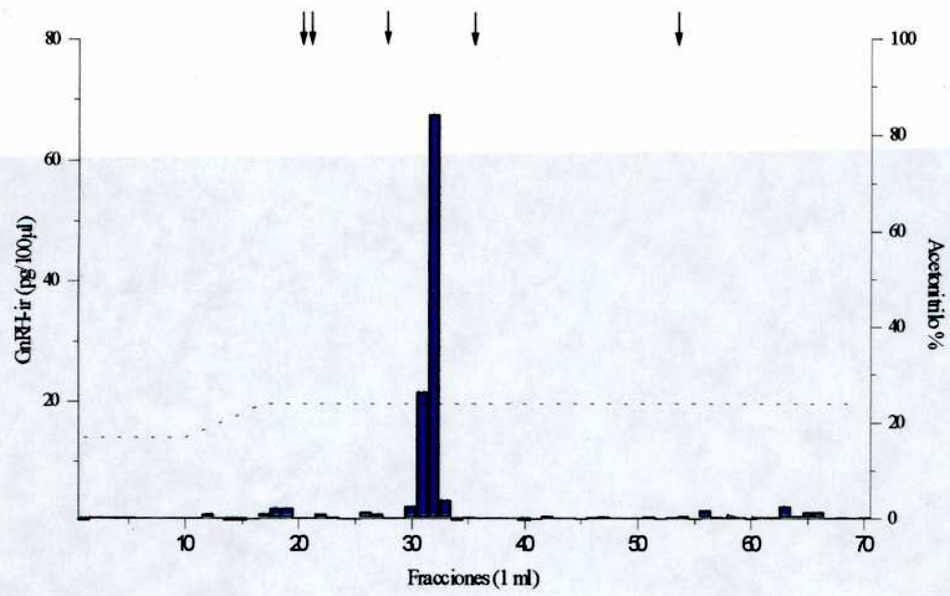


Figura 1-8c: Antisero PBL#45

Figura 1-10: Corrida de HPLC de extracto de testículo inmunodetectado con: a) antisuero PBL#45; b) antisuero PBL #49. Las flechas indican la posición de elución de las variantes sintéticas de GnRH cromatografiadas. La primer flecha a la izquierda indica el tiempo de elución de sbGnRH, la segunda flecha indica cIIGnRH, la tercer flecha indica dfGnRH y la última sGnRH.

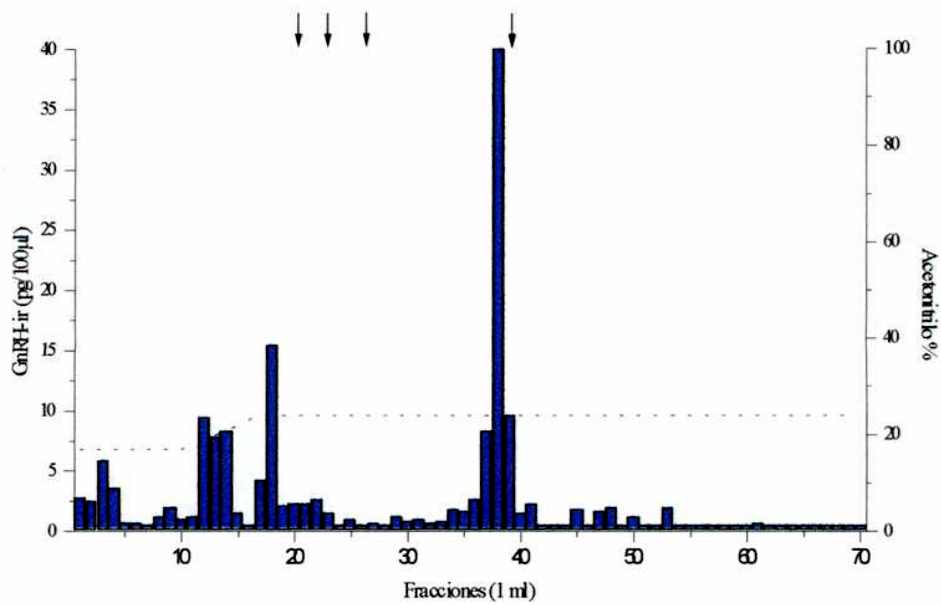


Figura 1-9a: Antisero PBL#45

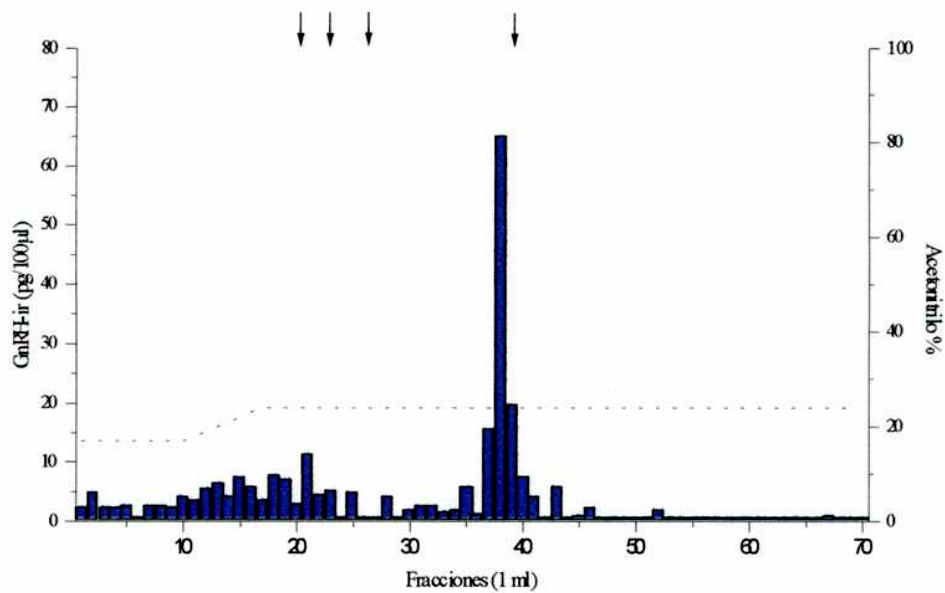


Figura 1-9b: Antisero PBL#49

mientras que dfGnRH desplazó en forma paralela a sGnRH indicando naturaleza distinta al estandar utilizado (Figura 1-8)

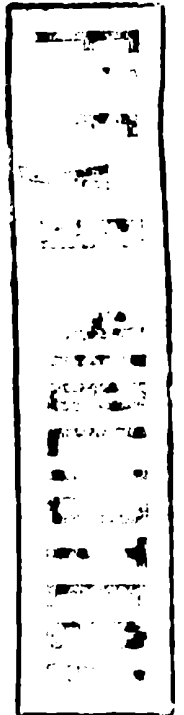
Experimento 5

A fin de determinar cual de las variantes presentes en tejido cerebral se liberan en las terminales nerviosas de la hipófisis, se analizó el extracto hipofisario como en el Experimento 1.

Los tres sistemas de RIA revelaron sólo un pico ir-GnRH correspondiente a la posición de elución del segundo pico ir-GnRH correspondiente al experimento del extracto cerebral. Este pico ir-GnRH (fracciones 31-32) no eluyó en la posición de ninguno de los estándares sintéticos analizados (Figuras 1-9a, 1-9b y 1-9c).

Experimento 6

El mismo tipo de análisis desarrollado con el extracto de cerebro e hipófisis fue empleado en el extracto de gónadas. Los tres sistemas de RIA (cII678, PBL#49 y PBL#45) no revelaron ningún pico de ir-GnRH en el extracto de ovario, mientras que los antisueros PBL#45 y PBL#49 revelaron la presencia de un único pico ir-GnRH en extracto de testículo (Figura 1-10). Este pico eluyó con la variante sintética sGnRH y en el estudio de paralelismo las pendientes de ambas curvas no difieren significativamente en ensayos homólogos con el antisuero sGnRH#2 (datos no mostrados).



I-VI Discusión

Los análisis de RP-HPLC en conjunto con el RIA del extracto cerebral de pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, revelan que el tejido nervioso de esta especie expresa tres variantes moleculares de GnRH. Dos de ellas tienen características similares a cGnRH-II y sGnRH, mientras que la tercera parece representar una variante no secuenciada hasta el momento.

La caracterización de las fracciones de RP-HPLC de los extractos cerebrales con tres sistemas de RIA (antisueros cII678, PBL#45 y PBL#49) muestran tres picos ir-

GnRH. El primer pico y el tercer pico tienen características inmunológicas y cromatográficas similares a cGnRH-II y sGnRH. En este sentido, es importante resaltar que el antisuero cII678 requiere la presencia de los extremos NH₂ y COOH terminales conservados para reconocer las distintas variantes de GnRH (Idler & Everard, 1987).

El análisis de diluciones seriadas de las fracciones que mostraban inmunoreactividad de las formas cGnRH-II y sGnRH no presentaron diferencias significativas con respecto a las curvas construidas con péptidos sintéticos, utilizando en cada caso antisueros específicos (cII675 para cGnRH-II, sGnRH #2 y sI668 para sGnRH). Estos estudios refuerzan los resultados obtenidos por RP-HPLC.

Es importante resaltar que el segundo pico ir-GnRH se comportó como cGnRH-II en un ensayo de paralelismo en un sistema RIA homólogo para cGnRH-II (antisuero cII675) pero no en el ensayo homólogo que utiliza sGnRH#2. Este ensayo llamó en parte la atención debido a la diferencia en los tiempos de elución aunque podría explicarse debido a la presencia de sitios comunes de reconocimiento con el antisuero. Por otra parte, Weber *et al.*, (1997) describieron en la tilapia *Oreochromis mossambicus*, la presencia de sbGnRH, cGnRH-II y sGnRH. En su análisis, sorprendentemente, sGnRH fue purificado y secuenciado a partir de material ir-GnRH de distinta posición de elución. Es posible que sGnRH que eluyó en posición no coincidente con el estándar sintético pudiera estar asociado a una proteína transportadora que modificara su posición de elución.

En este sentido, debido al reconocimiento, por un sistema homólogo para cGnRH-II, el segundo pico ir-GnRH en cerebro de pejerrey podría representar una segunda posición de elución de cGnRH-II, pero no la expresión de sGnRH asociado a una proteína transportadora.

El estudio co-cromatográfico confirma la expresión de cGnRH-II y sGnRH en tejido cerebral además de demostrar que el segundo pico no es debido a un corrimiento en la posición de elución de cGnRH-II. Tanto el primer como el tercer pico se ven aumentados en la corrida co-cromatográfica y la diferencia de masa cuantificada corresponde a los estándares sintéticos agregados al extracto cerebral. Sin embargo, si se compara el segundo pico ir-GnRH en ambas cromatografías, este no se modifica.

Este pico ir-GnRH, que en principio se pensó que podría ser debido a la expresión de dfGnRH, debido a su posición de elución similar, no presentó el mismo tiempo de retención que esta variante y pudo ser discriminado con uno de los antisueros utilizados en este análisis (sGnRH#2).

Como se sabe, los peces teleósteos, carecen de un sistema portal hipotálamo-hipófisis. Las células hipofisiarias están directamente inervadas por las terminales neurosecretoras hipotalámicas (Anglade *et al.* 1993; Ball, 1981; Peter *et al.*, 1990). De esta manera, el producto de liberación neuronal (en este caso, GnRH) puede determinarse a partir de extracto hipofisiario, ya que el mismo contiene los terminales neurosecretorios. El análisis por RIA de la cromatografía del extracto hipofisiario revela la presencia de una única variante de GnRH, variante que tiene características cromatográficas similares al segundo pico ir-GnRH del extracto cerebral. Este resultado indicaría que una sola variante de GnRH estaría relacionada con la regulación de gonadotrofinas de esta especie.

Tomados en conjunto todos estos resultados indican:

1. La presencia de tres variantes de GnRH en el cerebro del pejerrey bonaerense: cGnRH-II, sGnRH y una tercer variante.
2. Esta tercer variante posee características cromatográficas e inmunológicas diferentes a todas las variantes aisladas y secuenciadas hasta el momento. Esto sugiere la presencia de un nuevo miembro en esta familia de neuropéptidos.

Es un hecho común que los peces expresen en su sistema nervioso central al menos dos variantes de GnRH (Sherwood *et al.*, 1993a; 1997). Es importante destacar que cGnRH-II está presente en todas las especies de peces analizados hasta la fecha (Sherwood *et al.*, 1994; King & Millar, 1997). La segunda variante, varía dependiendo de la especie habiéndose descrito: sGnRH (Amano *et al.*, 1992; King & Millar, 1985; King *et al.*, 1995; Okusawa *et al.*, 1990; Powell *et al.*, 1996b; Sherwood *et al.*, 1984), cfGnRH (Bogerd *et al.*, 1992; Ngamvongchon *et al.*, 1992a, b) y mGnRH (King *et al.*, 1990b; O'Neill *et al.*, 1998).

Por otro lado en muchos perciformes, se han identificado por secuenciación tres variantes de GnRH: cGnRH-II, sGnRH y sbGnRH (Powell *et al.*, 1994; 1995; 1996b); por secuenciación de cDNA (Chow *et al.*, 1995; Gothilf *et al.*, 1995b; 1996; White *et al.*, 1995) o por métodos indirectos como HPLC y RIA (King & Millar., 1985; Miranda *et al.*, 1998; Powell *et al.*, 1996b; Sherwood *et al.*, 1984; 1993b). Además en caraciformes, un grupo de aparición más temprana, datos inmunológicos y cromatográficos evidenciaron la presencia de una tercer variante con características similares a sbGnRH además de cGnRH-II y sGnRH (Somoza *et al.*, 1994). La secuencia de esta tercer variante fue posteriormente determinada como sbGnRH en otra

especie del mismo orden (Powell *et al.*, 1997). La presencia de sbGnRH fue inferida también, luego de conocerse sus características cromatográficas de este neuropéptido, en Pleuronectiformes (Idler & Everard, 1987) y Gonorynchiformes (Sherwood *et al.*, 1984). Tomados en su conjunto, estos datos sugieren una amplia distribución de sbGnRH en peces teleósteos.

En el caso específico del pejerrey bonaerense, nuestro análisis sugiere que el tejido cerebral expresa tres variantes de GnRH: cIIIGnRH, sGnRH y una tercer variante claramente diferente a sbGnRH.

La función de un neuropéptido puede inferirse a partir de su distribución neuroanatómica, y en el caso particular de este GnRH descrito en el pejerrey, su localización podría indicar su acción sobre la síntesis y secreción de gonadotrofinas. Como se discutirá más adelante, en varios perciformes: *Spaurus aurata*, *Haplochromis burtoni*, los sitios de expresión de las tres variantes de GnRH son distintos y no existe co-expresión en ningún área (Gothilf *et al.*, 1996; White *et al.*, 1995). cGnRH-II es expresado por neuronas localizadas en el cerebro medio, no sólo en estas especies sino también en todas las especies analizadas hasta el momento utilizando anticuerpos específicos (Amano *et al.*, 1991; Leprête *et al.*, 1993; Yu *et al.*, 1988) y por hibridación *in situ* (Zandbergen *et al.*, 1995). Las células secretoras de sGnRH se localizan en los bulbos olfatorios y el nervio terminal y las neuronas productoras de sbGnRH se localizan en el área preóptica y proyectan sus terminales hacia la adenohipófisis (Gothilf *et al.*, 1996; White *et al.*, 1995).

En forma preliminar, se ha demostrado además, la presencia de ir-sGnRH en testículo, pero no en ovario de pejerrey. La ausencia de material ir-GnRH en ovario puede deberse a:

1. La muestra no fuera suficiente.
2. Esta molécula es expresada en otro momento del ciclo reproductivo.
3. La ausencia de expresión de GnRH en ovario.

Estos estudios deberían repetirse con mayor cantidad de material y con muestras tomadas en distintas épocas del año.

La presencia de GnRH en tejidos extrahipotalámicos parecería deberse a una expresión local dado que los niveles de este neuropéptido de origen hipotalámico en circulación general es muy baja como para permitir la unión al receptor a GnRH en otros tejidos como se ha demostrado en otras especies (Habibi & Pati, 1993a,b; 1994; Pati & Habibi *et al.*, 1992; 1993a,b). Además, se ha demostrado la expresión de ARNm

de GnRH en gónadas de otras especies de telósteos (Grober *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1996). En estos tejidos, GnRH tendría efectos parácrinos que todavía faltan analizar.

En conclusión, el análisis de extractos cerebrales e hipofisarios del pejerrey bonaerense, por RP-HPLC y RIA revela que el cerebro de esta especie expresa tres formas distintas de GnRH: cGnRH-II y sGnRH y una tercera forma aún no secuenciada. Esta nueva variante de GnRH sería la única que inerva la hipófisis.

Capítulo II: Localización neuroanatómica de las células y fibras GnRHérgicas

II-I Introducción

II-Ia Neuroanatomía del sistema GnRHérgico en gnastotomados

Dado que en la mayoría de los vertebrados, se expresan dos o más variantes de GnRH y que se desconoce el significado funcional de este fenómeno, es fundamental determinar la localización neuroanatómica del sistema GnRHérgico y su circuito para entender la regulación fisiológica y la actividad de estos neuropéptidos.

Desde la década de los 80', los estudios acerca de la distribución de los cuerpos neuronales que expresan GnRH y sus conexiones se llevaron a cabo principalmente con técnicas inmunocitoquímicas. Debido a la dificultad que existe en revelar la presencia de esta molécula, se han realizado importantes avances en la preservación del tejido, métodos para la visualización de los sitios de interacción antígeno-anticuerpo y el desarrollo de antisueros y anticuerpos monoclonales más sensibles y específicos.

En general, la utilización de técnicas inmunocitoquímicas para el estudio de la distribución de GnRH presenta ciertas dificultades comparado con otros neuropéptidos. Estas diferencias se basan en distintos puntos:

1. Los sistemas GnRHérgicos no están confinados a núcleos discretos a diferencia de otros sistemas peptidérgicos (vasopresina, oxitocina, cortocotropin-releasing hormone).
2. El número total de neuronas GnRH es pequeño.
3. GnRH es lábil, y la marca suele debilitarse durante las preparaciones histológicas rutinarias (Hoffman & Berghorn; 1997).

A medida que avanzaban las diversas líneas de investigación relacionadas con la ontogenia de las neuronas GnRHérgicas, la identificación de nuevas poblaciones de neuronas, y la caracterización de múltiples variantes de GnRH, los

modelos de organización de los sistemas neuronales de GnRH fueron cambiando. Como se mencionó anteriormente, se han secuenciado once formas en los vertebrados (Jimenez-Liñan *et al.*, 1997; Carolsfeld *et al.*, 1999), y por lo menos dos formas diferentes se expresan en la mayoría de las especies: cGnRH-II y una segunda variante que varía de especie a especie (King & Millar 1997).

Utilizando técnicas inmunocitoquímicas con antisueros que no discriminan entre las distintas variantes de GnRH se han identificado neuronas GnRHérgicas en la mayoría de las áreas del cerebro anterior y el cerebro medio y sus proyecciones nerviosas alcanzan la mayoría de las áreas del sistema nervioso central, el sistema circulatorio y el líquido céfalo-raquídeo.

Por otra parte, la distribución neuroanatómica de las neuronas GnRHérgicas parece conservarse en las especies de vertebrados estudiados, sugiriendo que los sistemas GnRHérgicos son filogenéticamente antiguos. A raíz de esto, se propuso un modelo sobre la distribución neuroanatómica de neuronas que expresan GnRH en vertebrados gnastotomados (Muske, 1993; 1997).

En este modelo, Muske describe dos sistemas principales: el sistema anterior también denominado sistema del nervio-terminal-área septal-preóptica (sistema NT-AS-APO) y el sistema posterior o sistema cGnRH-II del cerebro medio. Esta modelización se fundamenta en:

1. La mayoría de las especies de vertebrados expresan dos o más variantes de GnRH.
2. cGnRH-II está presente en la mayoría de los gnatostomados y se expresa en cuerpos neuronales localizados en el diencéfalo posterior o cerebro medio. La presencia prácticamente universal de cGnRH-II sugiere que este neuropéptido tiene una función muy importante que todavía no ha podido ser elucidada.
3. Otras formas de GnRH (mGnRH, cGnRH-I y sGnRH) se encuentran asociadas con el nervio terminal (NT) y se expresan en neuronas distribuidas en el piso del cerebro anterior, principalmente en el área septal y el área preóptica. En la mayoría de las especies, quizás en todas, estas neuronas están involucradas en la regulación de la liberación de las gonadotrofinas.
4. La mayoría de los vertebrados tetrápodos, presentan dos sistemas GnRHérgicos, con orígenes embriológicos distintos: el sistema NT-AS-APO y el sistema cGnRH-II del cerebro medio. El primer sistema se origina a partir de la placoda olfatoria y migra centripetamente durante el desarrollo en distintos grupos

de vertebrados: peces (Parhar, 1997, Parhar *et al.* 1998; White & Fernald, 1998a), anfibios (Murakami *et al.*, 1992; Northcutt & Muske, 1994), aves (Murakami *et al.*, 1991; Norgren & Leeman, 1991) y mamíferos (Ronnekleiv & Resko, 1990; Schwanzel-Fukuda *et al.*, 1996) mientras que el segundo sistema deriva del epéndima ventricular mesencefálico aunque sólo se ha dilucidado en peces teleósteos (Parhar, 1997, Parhar *et al.* 1998; White & Fernald, 1998).

II-Ia1 El sistema nervio-terminal-área septal y preóptica

En la mayoría de las especies, el sistema NT-AS-APO tiene la mayor proporción de neuronas GnRHérgicas. Estas neuronas, se distribuyen en forma difusa en el telencéfalo caudal y en el diencefalo anterior. La localización de neuronas GnRHérgicas en áreas tan rostrales como los bulbos olfatorios, no se realizó sino recién en 1981 (Münz *et al.*, 1981) en el caso de peces teleósteos y en 1988 en el caso de los mamíferos (Silverman *et al.*, 1988).

Estos últimos grupos celulares pertenecen al nervio terminal (NT), un pequeño nervio craneal asociado al sistema olfatorio (Schwanzel-Fukuda & Silverman, 1980; Stell *et al.*, 1984). El NT es considerado como un sistema quimiosensorial que mediaría las respuestas a feromonas (Dulka *et al.*, 1987; 1993). Este se origina en la placoda olfatoria y migra centralmente para conectarse con el cerebro anterior en desarrollo (Hoffman & Berghorn, 1997). Desde este punto de contacto (parte ventral del telencéfalo), el NT se continúa intracerebralmente a lo largo de la superficie ventro medial de los bulbos olfatorios proyectándose rostralmente hacia el epitelio olfatorio y caudalmente en el tracto olfatorio medial (TOM) hacia el telencéfalo ventral, al núcleo ventral del área *ventralis telencephali* (Vv), al núcleo supracomisural del área *ventralis telencephali* (Vs) y del área preóptica (APO), y algunas de estas células también se proyectan hacia la retina (Sloan & Demski, 1987). El NT tiene componentes intra y extra cerebrales y las neuronas GnRHérgicas se disponen a lo largo de todos sus segmentos centrales y periféricos. En mamíferos tetrápodos, las neuronas pertenecientes al TN se ubican en la parte más caudal, contiguas al núcleo del área septal, por lo tanto, aunque inicialmente se los consideraba unidades separadas, en la mayoría de las especies no hay marcadores bioquímicos ni citoarquitectónicos

que distinguen ambos tipos de grupos neuronales y es así como se los considera parte de un mismo sistema. Además, los nuevos aportes acerca del desarrollo ontogenético, consideran que estos grupos neuronales tienen un origen embriológico común, y que se proyectan hacia las mismas áreas cerebrales (Kawamura & Kikuyama, 1998).

El sistema nervio-terminal-área septal y preóptica parecería ser el principal regulador del eje cerebro-hipófisis-gónadas, siendo responsables directos de la liberación de gonadotrofinas, las neuronas del área septal y preóptica (Muske, 1997). En todos los vertebrados, excepto en peces cartilagosos (D'Antonio *et al.*, 1995), el GnRH llega a la glándula hipófisis a través de la vía principal que se proyecta desde el área septal y preóptica a través del infundíbulo. Los axones ir-GnRH, hacen sinapsis directamente sobre los gonadotropos (teleósteos; Kah *et al.*, 1986), en el lóbulo neural de la hipófisis como en agnatos (Nosaki *et al.*, 1994) o liberan su contenido en circulación portal como en vertebrados tetrápodos (Kalra, 1993).

Peces

Peces cartilagosos

Los peces cartilagosos se caracterizan por poseer un NT bien desarrollado, y a diferencia del resto de los vertebrados, se trata de una entidad independiente que corre en forma separada y paralela al nervio olfatorio. En todas las especies en donde se estudió el NT, se describió un ganglio con neuronas ir-GnRH localizado en la sección extra-cerebral del nervio. Estudios inmunocitoquímicos revelaron escasas neuronas ir-GnRH en el área preóptica y una inervación difusa en el *infundibulum* (Demski *et al.*, 1997). Se hipotetiza que en este grupo, GnRH llegaría a la hipófisis por la circulación general basándose en el hecho de que las neuronas del NT liberan su contenido vesicular a los vasos sanguíneos (Muske, 1997) y en el hallazgo de que la concentración de GnRH en circulación general es similar a la concentración portal en tetrápodos (Demski *et al.*, 1997; Sherwood & Lovejoy, 1993).

Como en otros vertebrados, los peces cartilagosos expresan más de una variante de GnRH. Hasta el momento, dfGnRH parecería exclusiva de esta clase (Lovejoy *et al.*, 1992a). Si bien la organización de las neuronas GnRHérgicas en este grupo no está perfectamente dilucidada, los resultados obtenidos hasta el momento parecerían indicar que sigue el mismo patrón que en otros vertebrados. De esta forma, las neuronas localizadas en el cerebro medio expresarían cGnRH-II mientras que las neuronas del NT expresarían dfGnRH y otras variantes aún no identificadas (King & Millar, 1997; Demski *et al.*, 1997); sin embargo, tanto dfGnRH como cGnRH-II han sido aisladas a partir de extractos del NT indicando que no existiría una diferenciación anatómica tan clara como en otros grupos de vertebrados (Lovejoy *et al.*, 1992b; Demski *et al.*, 1997)

Teleósteos

Así como en vertebrados tetrápodos, el sistema TN-AS-APO en peces teleósteos, tiene el mismo patrón de neuronas GnRHérgicas distribuidas desde el sistema olfatorio hasta el hipotálamo. Este patrón de distribución se describió desde peces primitivos (Lêprete *et al.*, 1993; Montero *et al.*, 1994; Münz *et al.*, 1987) hasta euteleósteos (Amano *et al.*, 1991; Münz *et al.*, 1987; Kah *et al.*, 1986; Kim *et al.*, 1997; Kudo *et al.*, 1994). Un resumen de esta información puede encontrarse en Muske (1997).

Un segundo patrón neuroanatómico caracterizado por una organización agrupada de neuronas GnRHérgicas fue descrito en *Acanthopterygii* (Gothilf *et al.*, 1996; Breuckmann *et al.*, 1996, Kahn & Thomas, 1993; Münz *et al.* 1981, 1982, Oka & Ichikawa, 1990; White *et al.*; 1995) y en *Paracanthopterygii* (Grober *et al.*, 1995). En estos peces, las neuronas que expresan GnRH se localizan en dos áreas distintas: el núcleo *olfacto retinalis* (NOR) y el área preóptica (APO). El NOR se localiza en la zona de transición entre el bulbo olfatorio caudo-ventral y el telencéfalo ventro rostral y recibe su nombre dado que sus neuronas se proyectan hacia el bulbo olfatorio y hacia la retina (Münz *et al.*, 1981). Sobre la base de la inmunoreactividad a GnRH (ir-GnRH) y la morfología de estas neuronas, se considera que el NOR correspondería al ganglio del nervio terminal de los Cypriniformes (Münz *et al.*, 1987).

¿Cuál es la relación entre los dos grupos neuronales localizados en el NOR y en el APO?. Existen muchas evidencias que demuestran que existen diferencias embriológicas y funcionales. Estudios anatómicos y electrofisiológicos realizados en *Colisa lalia* (Oka, 1997), apoyarían la hipótesis que sostiene que la evolución del sistema GnRHérgico del NT-AS-APO en las poblaciones neuronales ha sido acompañado por una divergencia funcional y de conexión entre ellas. Estudios inmunocitoquímicos demostraron que las células del NOR se proyectan hacia diversas áreas del cerebro así como hacia la retina y la médula (Oka, 1997). Sin embargo, las neuronas GnRHérgicas localizadas en el APO se proyectan solamente hacia la hipófisis anterior (Breuckmann *et al.*, 1996; Oka & Ichikawa, 1990; Yamamoto *et al.*, 1995; 1998a). Esta relación anatómica llevó a hipotetizar que la regulación de la liberación de gonadotrofinas depende fundamentalmente de la población de neuronas ubicadas en el APO mientras que aquellas localizadas en el NOR servirían como modulador central, aunque su función no está claramente determinada (Kim *et al.*, 1997).

Es importante recalcar, que en algunas especies de Perciformes se ha demostrado por hibridación *in situ*, que las variantes de GnRH sintetizadas en ambos núcleos son diferentes (Gothilf *et al.*, 1996; White *et al.*, 1995; White & Fernald, 1998). En estos casos, las células productoras de sGnRH se ubican en los bulbos olfatorios y el NT mientras que las células productoras de sbGnRH en el APO y en el tálamo ventral. En *Oreochromis mossambicus* (Parhar, 1997), *Oryzias latipes* (Parhar *et al.*, 1998) y en *Haplochromis burtoni* (White & Fernald, 1998), se demostró además que estas dos poblaciones neuronales tienen orígenes embriológicos distintos. Las neuronas GnRHérgicas del NOR se originan en la placoda olfatoria, mientras que las neuronas del APO se originan en el piso del telencéfalo basal y del área preóptica anterior en *Oreochromis mossambicus* y *Oryzias latipes* (Parhar, 1997; Parhar *et al.*, 1998), aunque ambas poblaciones parecen originarse de la placoda olfatoria en *Haplochromis burtoni* (White & Fernald, 1998).

Un tercer patrón de organización neuronal, se describió en Osteoglosiformes Münz & Class (1987). En las especies analizadas, las neuronas GnRHérgicas se limitan a la cavidad olfatoria, al nervio olfatorio, cerca a su unión al bulbo olfatorio. No se determinaron neuronas ir-GnRH en el telencéfalo ni en el diencéfalo, y la inervación de la hipófisis parece originarse del grupo neuronal del

NT. Sin embargo estos resultados podrían ser el fruto del uso de antisueros inapropiados. El conocimiento de nuevas variantes de GnRH y el desarrollo de nuevos antisueros podrían modificar estos resultados.

Anfibios

La organización de las neuronas en el sistema nervio-terminal-área septal y preóptica en los anfibios es un buen modelo de estudio para poder comprender la neuroanatomía del sistema GnRHérgico en el cerebro anterior. En este sentido se considera que la organización anatómica relativamente simple de urodolos adultos representaría un nivel de organización similar al de los vertebrados ancestrales (Herrick, 1948; Northcutt, *et al.*, 1980) y en algunos casos correspondería a estadios tempranos de desarrollo en otras especies (Roth *et al.*, 1993). Este modelo animal, así como también el de las aves, muestran una ventaja adicional, ya que los huevos fertilizados se desarrollan fuera del ambiente uterino y las manipulaciones experimentales pueden desarrollarse en etapas tempranas del desarrollo. Además, el sistema nervio-terminal-área septal y preóptica en los anfibios es una versión simplificada del mismo sistema en otros vertebrados, especialmente los mamíferos.

El nervio terminal en *Taricha granulosa* se contacta con el cerebro a nivel del bulbo olfatorio, y desde allí discurre ventral y medialmente entre las meninges y en la superficie del telencéfalo anterior (Muske, 1997). La mayoría de los cuerpos neuronales de GnRH en esta salamandra se disponen en el segmento extra-cerebral, incluyendo un grupo ganglional que puede homologarse al ganglio terminal en mamíferos. A nivel del telencéfalo medio, donde algunas fibras del NT entran en el cerebro, hacia el telencéfalo caudal y el área preóptica se encuentran un número pequeño de neuronas superficial a los núcleos del área preóptica y septal. Las neuronas del cerebro anterior expresan una única variante de GnRH (mGnRH) y se distribuyen como un continuo a lo largo del TN. Este patrón de distribución es compartido por todas las especies estudiadas (Andersen *et al.*, 1992; Miranda *et al.*, 1998a).

El hecho de que las células ir-GnRH no se dispongan como núcleos cerebrales hace suponer que como ocurre con el nervio terminal mismo, las neuronas GnRHérgicas de este sistema provienen de células precursoras en la placoda olfatoria y migrarían hacia el cerebro con el desarrollo del nervio terminal

(Muske & Moore, 1987; Muske, 1988). Eso fue posteriormente corroborado tanto por remoción quirúrgica de la placoda olfatoria en embriones en desarrollo (Murkami *et al.*, 1992, Northcutt & Muske, 1994) como por la obtención de evidencias neuroanatómicas de la migración neuronal desde el nervio olfatorio hacia el telencéfalo ventral (Somoza *et al.*, 1996).

Las neuronas que expresan cGnRH-II en anfibios se encuentran se encuentran ubicadas en áreas periventriculares del diencéfalo caudal y el cerebro medio (Muske, 1997; Muske & Moore, 1994). Es importante resaltar que la ablación experimental de la placoda olfatoria si bien lleva a la ausencia completa de neuronas GnHérgicas en el cerebro anterior no afecta a las neuronas que expresan cGnRH-II ubicadas en el cerebro medio. La posición de estas neuronas hace suponer que, así como otras neuronas, se diferencian a partir del epéndima ventricular (Northcutt & Muske, 1994).

Reptiles y Aves

A pesar de que la información de la distribución neuroanatómica de las distintas poblaciones neuronales GnRHérgicas en estos dos grupos es menor, se ha inmunodetectado la presencia de las mismas en el cerebro anterior de distintas especies de aves y reptiles: gallina (Kuenzel & Blahser, 1991), paloma (Norgren *et al.*, 1992), pavo (Millam *et al.*, 1993), un lagarto, *Podarcis sicula* (Masucci *et al.*, 1992) y una culebra (Smith & Moore, 1996). En gallinas, también se ha demostrado inmunocitoquímicamente la migración de neuronas GnRHérgicas a partir de la placoda olfatoria (Murakami *et al.*, 1991; Norgren *et al.*, 1991; 1995). Estas células desaparecen cuando se realiza ablación de la placoda olfatoria (Akatsu *et al.*, 1992).

En las aves, las células ir-GnRH se extienden desde el área preóptica caudo-dorsalmente hacia el septum lateral (Ball & Hahn, 1997). Estas células, proyectan fibras hacia todas las zonas de la eminencia media anterior y posterior. A la eminencia media llegan dos grupos principales de fibras. El primer grupo parece originarse de las células más anteriores, principalmente del área preóptica, y corren por el área supraquiasmática y la pared del ventrículo antes de entrar a la eminencia media. El segundo grupo de neuronas, se proyectan caudo-ventralmente desde las células más dorsales conformando una red difusa a través de las regiones

infundibulares antes de entrar a la eminencia media (Ball & Hahn., 1997). Estudios inmunocitoquímicos y de perfusión de fragmentos de distintas áreas cerebrales, realizados en distintas especies, demostraron que las terminales nerviosas que alcanzan la eminencia media y liberan el producto de secreción a la circulación portal expresan cGnRH-I (Mikami *et al.*, 1988; Millan *et al.*, 1998). Las neuronas que expresan cGnRH-II fueron sólo detectadas en el mesencéfalo, en la región oculomotor, área que no presenta proyecciones hacia la eminencia media (Mikami *et al.*, 1988).

Mamíferos

La organización y desarrollo del sistema nervio-terminal-área septal y preóptica en mamíferos, aunque un poco más compleja, se asemeja al de anfibios. Como en estos últimos, este sistema expresa mGnRH. Rostralmente, las neuronas y fibras GnRHérgicas se disponen ventralmente en los bulbos olfatorios y el telencéfalo extendiéndose a sitios intracerebrales dentro del tubérculo olfatorio y el septum. Caudalmente, la población neuronal de GnRH, forma una red desde el núcleo septal y la banda diagonal de Broca hasta el núcleo de *la stria terminalis*, y hasta las regiones preóptica, quiasmática e hipotalámica anterior (Schwankel-Fukuda, 1997; Silverman *et al.*, 1994). En rata (Ronnekleiv *et al.*, 1989), ratón (Wray *et al.*, 1989) y primates (Standish *et al.*, 1987), la localización de los cuerpos neuronales GnRH se ha confirmado utilizando hibridación “*in situ*”.

II-Ia2 El sistema chicken II GnRH del cerebro medio

Münz *et al.* (1981) describieron por primera vez un grupo de neuronas ir-GnRH de gran tamaño en el tegmentum mesencefálico, separado del eje nervio-terminal-área septal y preóptica. Este “nuevo” grupo de células fue descrito como dispuesto ventralmente al tercer ventrículo, caudal a la comisura posterior y rostral al núcleo del nervio oculomotor. En algunos casos, estas células mostraban características inmunocitoquímicas diferentes a las neuronas del cerebro anterior. En peces primitivos (Leprête *et al.*, 1993), peces teleósteos (Amano *et al.*, 1991; Dufour *et al.*, 1993; Montero *et al.*, 1994; Yamamoto *et al.*, 1995), aves (Millan *et al.*, 1993), anfibios (Conlon *et al.*, 1993; Muske & Moore.; 1994, Northcutt &

Muske, 1994), reptiles (Bennis *et al.*, 1989; Smith & Moore., 1996) y mamíferos (Dellovade *et al.*, 1993; Kasten *et al.*, 1996; King *et al.*, 1989; 1990a; 1994; Lescheid *et al.*, 1997; White *et al.*, 1998) se ha confirmado que estas células expresan cGnRH-II.

Las células ir-cGnRH-II se disponen centralmente en la unión del diencéfalo caudal y el tegmentum anterior del cerebro medio, caudal a la comisura posterior. La característica principal de este tipo celular es que son de gran tamaño (denominadas magnocelulares) y son pocas en número. Este tipo de células fueron descritas en teleósteos, anfibios y aves (Muske, 1997).

Las fibras ir-cGnRH-II se distribuyen hacia todas las áreas principales del cerebro. En los anfibios, estas fibras son particularmente abundantes en el telencéfalo ventro-medial, área preóptica e hipotalámica, mientras que las proyecciones al cerebro anterior son escasas (Muske, 1997). Esta distribución difiere con otros casos estudiados, como en algunos teleósteos (Amano *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1995), y en la musaraña (Rissman *et al.*, 1995), donde las fibras ir-cGnRH-II se proyectan hacia regiones caudales al hipotálamo, y las fibras provenientes del sistema NT predominan en el cerebro anterior e infundíbulo; y en el pavo (Millan *et al.*, 1993) las fibras ir-cGnRH-II aunque son abundantes en todo el cerebro, no alcanzan la eminencia media.

II-II Objetivo

En esta parte de la Tesis, se presenta un análisis del sistema GnRHérgico del cerebro del pejerrey. A fin de poder elucidar la distribución neuroanatómica de las distintas variantes de GnRH en esta especie, se utilizaron técnicas inmunocitoquímicas con antisueros generados contra distintas variantes de este neuropéptido.

II-III Materiales y Métodos

II-IIIa Animales

Se utilizaron ejemplares adultos de ambos sexos capturados principalmente en el período reproductivo primaveral en la Laguna Salada Grande (Partido de Madariaga, Prov. de Buenos Aires). Ver Capítulo I para más detalles.

II-IIIb Preparación de tejidos

Los animales fueron sacrificados por decapitación, el cerebro expuesto y colocado en solución fijadora (paraformaldehído 4%, ácido pícrico 0.2%, en buffer fosfato salino (PBS), 0.05 M, pH 7.4, por 24hs a 4°C (Montero *et al.*, 1994). Posteriormente se disecaron y se pasaron a solución PBS-sacarosa 15%, por 24 hs. a 4°C para luego ser colocados en una solución de criopreservación (sacarosa 30%, polivinil-pirrolidona 15%, etilenglicol 30% en PBS) a -20 °C hasta su procesamiento (Watson *et al.*, 1986).

Un día antes de proceder a cortar la pieza, se colocó la misma en PBS-sacarosa 15% en donde se deja a 4°C hasta su procesamiento. Los cortes se realizaron en crióstato (-20°C) en sentido transversal y sagital a 40µm. Posteriormente, se montaron en portaobjetos pretratados con gelatina 2% y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los cortes se almacenaron luego a -20°C hasta el momento de la realización de las técnicas inmunocitoquímicas.

II-IIIc Técnicas inmunocitoquímicas

El protocolo utilizado se basó en la técnica previamente descrita por Miranda *et al.* (1998). Se utilizaron cuatro antisueros policlonales y un monoclonal generados contra distintas variantes de GnRH, cuyas diluciones y características se describen en la Tabla 2-1.

Se utilizaron dos antisueros específicos para sGnRH (sGnRH#2, s1668); un específico para cGnRH-II (cII741), un antisuero que reconoce al menos cinco variantes de GnRH (PBL#49) y el anticuerpo LRH13 que reconoce la región de los aminoácidos serina y tirosina de las variantes conocidas de GnRH, pero que tiene muy poca afinidad por cGnRH-II donde la tirosina es reemplazada por una histidina (Park and Wakabayashi, 1986).

A/S	Dilución	GnRH radiomarcado	GnRH estándar	mGnRH	cGnRH-I	cGnRH-II	sGnRH	LGnRH-I	cGnRH	dfGnRH	LGnRH-III
LRH13	1:2000	(³ H)mGnRH	mGnRH	100	600	30	830	nd*	nd*	nd*	nd*
CI1741	1:1000	(¹²⁵ I) cGnRH-II	cGnRH-II	<0.01	<0.01	100	3.5	0.2	nd*	nd*	nd*
PBL-49	1:1000	(¹²⁵ I) sGnRH	sGnRH	93.3	333.3	32.6	100	2	nd*	4.59**	nd*
SGnRH#2	1:1000	(¹²⁵ I) sGnRH	sGnRH	< 0.01	< 0.01	1.58	100	0.08	nd*	398**	nd*
S1668	1:10000	(¹²⁵ I) sGnRH	sGnRH	< 0.01	< 0.01	0.7	100	0.4	nd*	nd*	nd*

Tabla 2-1: Porcentaje de reactividad cruzada calculada a partir de la masa del análogo necesaria para inhibir la unión de GnRH ionizado al antisuero en un 50% en radioinmunoensayos homólogos. Cabe aclarar que la reactividad cruzada en los sistemas de RIA no pueden ser directamente aplicados a las técnicas inmunocitoquímicas, se proporcionan estos datos como referencia, con el fin de caracterizar los antisueros y el anticuerpo. Los antisueros fueron gentilmente cedidos por: LRH13, Dr. Wakabayashi, Hormone Assay Center, Institute of Endocrinology, Universidad de Gumma, Japón; CI1741 y S1668, Dr. J.A. King, Dept. Chemical pathology, Medical School, University of Cape Town, Sud Africa; PBL#49, Dr. W. Vale, The Salk Institute, The Clayton Foundation Laboratories for the Peptide Biology; sGnRH#2, Dr. K. Aida, Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, University of Tokyo, Japón.

La inmunodetección con el primer antisuero o anticuerpo se llevó a cabo de 24 a 48 horas a 4 °C. La detección del primer antisuero se realizó con un segundo anticuerpo universal biotinilado (Vector Laboratories, Inc) por 1 hora a temperatura ambiente. Para la intensificación de la señal se utilizó el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (Vector Laboratories, Inc) y se reveló con diaminobencidina (DAB) 0.03%, en buffer Tris salino 0.05M, pH 7.4 con H₂O₂ 0.04%. Todos los lavados se realizaron en PBS 0.05M, pH 7.4, Triton X-100 0.2% (PBS-T). Previo a la incubación con los antisueros, los cortes fueron incubados con suero normal de caballo (Vector Laboratories, Inc) por 20 min., para reducir la marca inespecífica. Finalmente, los cortes se deshidrataron con alcoholes crecientes, aclarados con xilol y montados con bálsamo sintético (Eukitt).

La especificidad de la marca inmunocitoquímica fue controlada por:

1. El reemplazo del primer antisuero con el buffer de trabajo (PBS-T).
2. El reemplazo del primer antisuero con suero normal de caballo.
3. La preadsorción del antisuero con concentraciones variables (0.01 a 1µM) del antígeno específico para cada antisuero (sGnRH o cGnRH-II; Peninsula Laboratories, Belmont, CA). En estos casos se solubilizó el antígeno en el antisuero diluido y se incubó toda la noche a 4 °C bajo agitación constante.

II-IV Resultados

Debido a que el pejerrey, es un animal hasta ahora poco utilizado como modelo de trabajo en una investigación científica, para la realización de este estudio no se contó con bibliografía adecuada para el estudio exhaustivo de su sistema nervioso central. En función de esto, el estudio se basó en la localización de fibras y cuerpos neuronales de ir-GnRH de acuerdo a atlas elaborados sobre el cerebro de otras especies de peces teleósteos (Peter & Gill, 1975a; b; Maler *et al.*, 1991).

Con cada uno de los antisueros utilizados, se obtuvieron resultados similares en cuanto a la distribución general de GnRH. Los procesos neuronales productores de GnRH, reveladas con las técnicas descritas anteriormente, se observaron al microscopio óptico como fibras con varicocidades o cuentas de rosario en vista longitudinal o como puntos marrones oscuros en vista transversal

(Fotos 2a,2b), por otra parte se observaron cuerpos neuronales, donde los núcleos pueden diferenciarse, ya que se observan como una zona más tenue, sin inmunomarca.

La localización de neuronas ir-GnRH, está representada en los esquemas correspondientes a los cortes transversales de cerebro de pejerrey realizados con cámara clara (Figuras 2-1; 2-2; 2-3).

Los antisueros PBL#49, sGnRH#2 y cII741, reconocieron tres grupos neuronales bien definidos:

1. El primer grupo de neuronas corresponde al *Nucleus olfacto retinalis* (NOR), núcleo considerado homólogo al ganglio del nervio terminal de otros peces teleósteos (Münz *et al.*, 1987) (Figura 2-1; Fotos 2-c; 3-a; 3-b; 3-c). Este ganglio se localiza en posición ventral entre el bulbo olfatorio y la región anteroventral del telencéfalo.

Los cuerpos neuronales localizados en este núcleo tienen forma ovoidal, y un diámetro aproximado mayor a 20µm.

2. El segundo grupo de células ir-GnRH se encuentra en el área preóptica anterior (APOA) y más específicamente en el *Nucleus preopticus periventricularis* (NPP) de acuerdo a la clasificación de Peter & Gill (1975a;b) (Figura 2-2, Fotos 4-a; 4-b; 4-c; 4-d).

Estas neuronas tienen forma estrellada y un diámetro mayor aproximado de 16µm. Entre estos dos grupos neuronales, se inmunodetectó una serie de neuronas ir-GnRH dispersas localizadas entre fibras GnRHérgicas. Estas células se localizan en la porción ventral del telencéfalo y no se encuentran asociadas a ningún núcleo neuronal en particular (Foto 2-c).

3. El tercer grupo de neuronas corresponde al tegmentum dorsal del área mesencefálica inmediatamente caudal a la comisura posterior (Figura 2-3, Foto 5).

Estas neuronas tienen un tamaño aproximado de 30µm de diámetro.

Es importante recalcar que con el uso del anticuerpo LRH13 y del antisuero s1668 se reconoció material ir-GnRH en el NOR y en el NPP pero no en el núcleo mesencefálico.

En cuanto a las fibras ir-GnRH, éstas discurren antero-posteriormente desde el bulbo olfatorio (concentradas fundamentalmente en la capa glomerular) y penetran al telencéfalo anterior a través del tracto olfatorio medial, el tracto olfatorio lateral y el nervio terminal. El tracto olfatorio medial y el nervio terminal

discurren por la cara medio-ventral externa del telencéfalo e incluyen en su recorrido a las neuronas del NOR. Durante su trayecto, numerosas fibras de grosor variable invaden la región medio-ventral del telencéfalo incluyendo a los núcleos del área *ventralis telencephali pars ventrali* (VV), *ventralis telencephali pars lateralis* (VL) y *ventralis telencephali pars dorsalis* (VD). El tracto olfatorio lateral discurre por la fisura *endorrinalis* penetrando en forma homogénea por las áreas del telencéfalo lateral: *area dorsalis telencephali pars centrali* (DCd), *area dorsalis telencephali pars dorsalis* (Dd), *area dorsalis telencephali pars lateralis* (DL) y *area dorsalis telencephali pars medialis* (DM). A nivel del diencefalo, las fibras continúan su recorrido antero-posterior muy cercanas a la pared del tercer ventrículo atravesando los núcleos NPP, *anterioris periventricularis* (NAPV) del área preóptica, *lateral tuberis pars anterioris* (NLTA) y *lateral tuberis pars posterioris* (LLTI) de la región del *cinereum*. Posteriormente, se dividen en dos ramas: una ventral que penetra a la hipófisis y una dorsal que invade el diencefalo posterior, concentrándose en el fundamentalmente en el hipotálamo, y el mesencéfalo. En el mesencéfalo, el tectum óptico recibe una invasión masiva de fibras ir-GnRH; éstas fibras se distribuyen dentro de los distintos estratos del tectum: *stratum album centrale*, *stratum griseum centrale* y el *stratum fibrosum griseum superfisiali*. También se inmunodetectaron fibras ir-GnRH en el tegmentum, especialmente en el *torus semicircularis*.

Es importante recalcar que la rama ventral que penetra a la hipófisis alcanza las tres zonas de la hipófisis: *Pars Distalis Rostral* (RPD); *Pars Distalis Proximal* (PPD) y *Pars Intermedia* (PI).

Con el fin de poder discriminar cuales de las variantes de GnRH se expresan en los diferentes núcleos GnRHérgicos, procedimos a realizar inmunomarcaciones preadsorbiendo los antisueros con sGnRH y cIIGnRH. Las concentraciones de antígeno utilizados fueron: 0.01 μ M, 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M.

En concentraciones mayores a 1 μ M, las marcas ir-GnRH desaparecían completamente, mientras que en concentraciones menores del antígeno, en algunos casos estas marcas permanecían. Tanto en los casos de permanencia de la marca como de ausencia de la misma, el efecto se daba por igual en todas las áreas cerebrales. Debido a esto, en ningún caso fue posible discriminar los núcleos productores de sGnRH, la variante nueva o cIIGnRH.

Abreviaturas

CA comisura anterior
CM *corpus mamillare*
Dd *area dorsalis telencephali pars dorsalis*
DCd *area dorsalis telencephali pars centralis*
DI *area dorsalis telencephali pars lateralis*
Dm *area dorsalis telencephali pars medialis*
LLTI *nucleus lateral tuberis pars posterioris*
Lv *area dorsalis telencephali pars lateralis*
Mt tegmento medial
NAPv *nucleus anterioris periventricularis*
NDLI *nucleus diffusus lobi inferioris*
NG *nucleus glomerulosus*
NLTa *nucleus lateral tuberis pars anterioris*
NRL *nucleus recessus lateralis*
Nopt nervio óptico
NOR *nucleus olfacto retinalis*
NPGC *nucleus preglomerulosus pars medialis*
NPP *nucleus preopticus periventricularis*
Nter nervio terminal
Nt *nucleus tenia*
PI *pars Intermedia*
PPD *pars distalis Proximal*
RPD *pars distalis Rostral*
TI tracto lateral
Tom tracto olfatorio medial
Topt *tectum óptico*
Vd *area ventralis telencephali pars dorsalis*
Vv *area ventralis telencephali pars ventrali*

Nomenclatura basada en Peter, R. *et al.*, J. Comp. Neurol. 159:103-128.1975

Foto 2a: Fibras ir-GnRH localizadas en el tectum óptico(A:200×). Anticuerpo LRH13.

Foto 2b: Fibras ir-GnRH (A:400×). Anticuerpo LRH13.

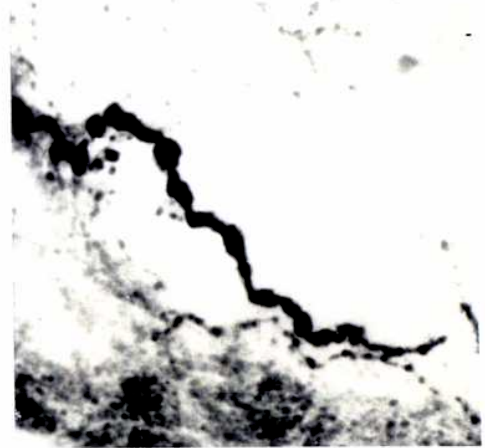
Foto 2c: Grupo neuronal ir-GnRH correspondiente al NOR y grupo neuronal ir-GnRH correspondiente al NPP (A:80×). Anticuerpo LRH13.

Foto 2d: Detalle de una neurona ir-GnRH señalada en la Foto 2 (A:400×).

F2_a



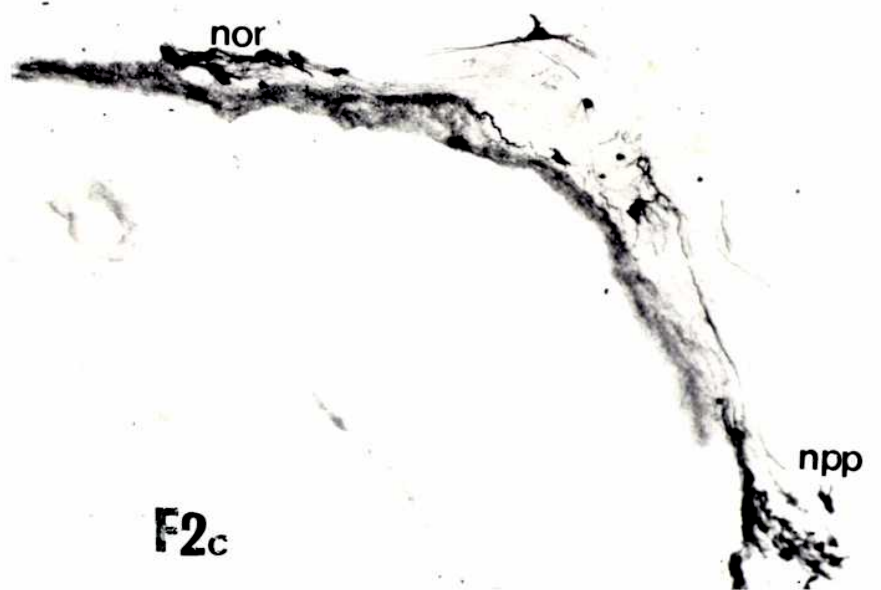
F2_b



nor

npp

F2_c



F2_d

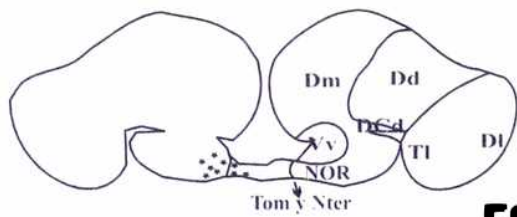


Figura 2-1: Esquema que representa un corte transversal de cerebro de pejerrey. Las estrellas representan el grupo neuronal ir-GnRH correspondiente al NOR.

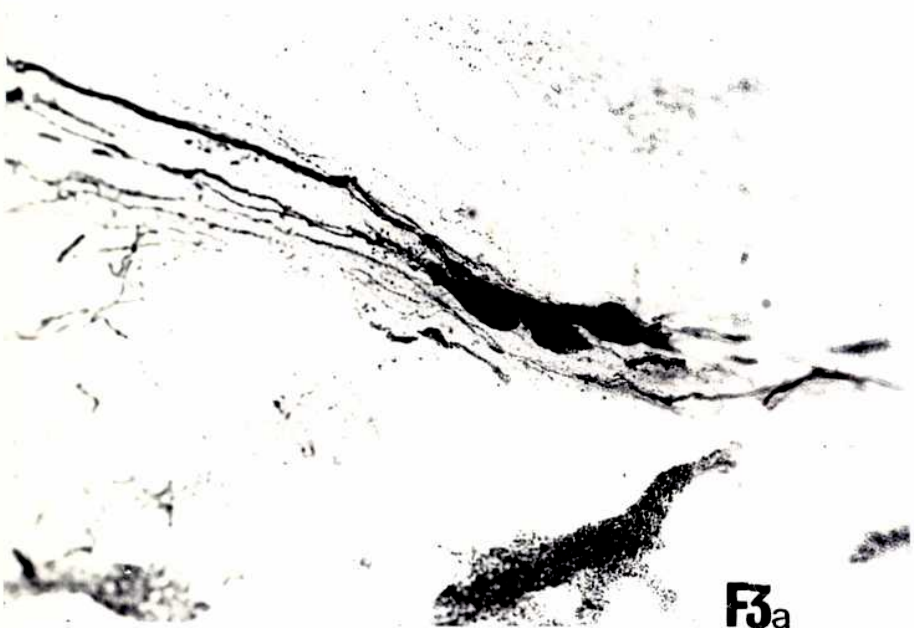
Foto 3a: Neuronas ir-GnRH correspondientes al NOR (A:250×). Anticuerpo LRH13.

Foto 3-b: Idem (A:400×). Anticuerpo LRH13.

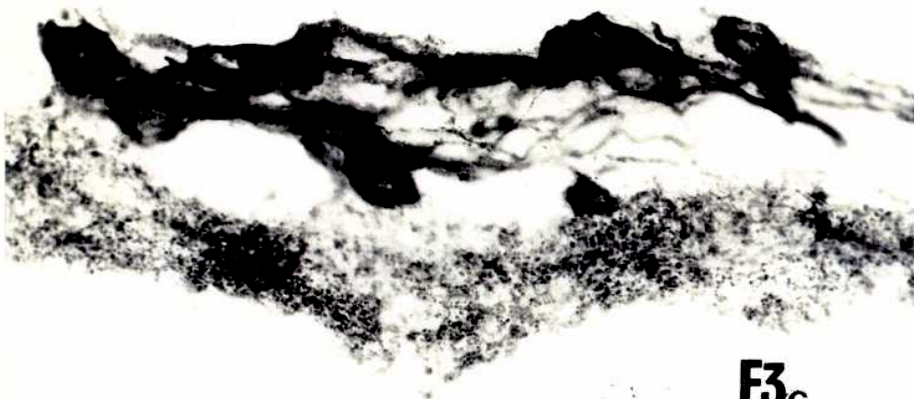
Foto 3-c: Idem (A:400×). Antisuero sGnRH#2.



F2-1



F3a



F3c



F3b

Figura 2-2: Esquema que representa un corte transversal de cerebro de pejerrey. Las estrellas representan el grupo neuronal ir-GnRH correspondiente al NPP (área preóptica).

Foto 4a: Neuronas ir-GnRH correspondientes al NPP (A:40×). Antisuero sGnRH#2.

Foto 4-b: Neurona ir-GnRH correspondiente al NPP (A: 500×). Anticuerpo LRH13.

Foto 4-c: Grupo de neuronas ir-GnRH correspondientes al NPP (A: 200×). Anticuerpo LRH13.

Foto 4-d: Idem (A:250×). Antisuero s1668.

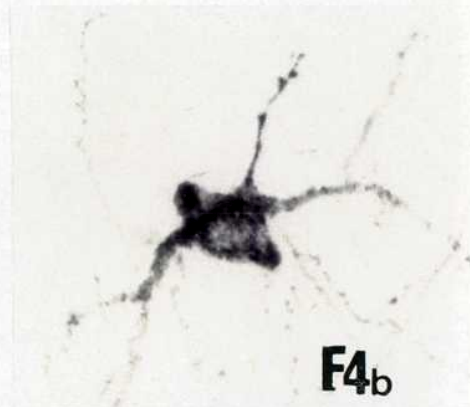
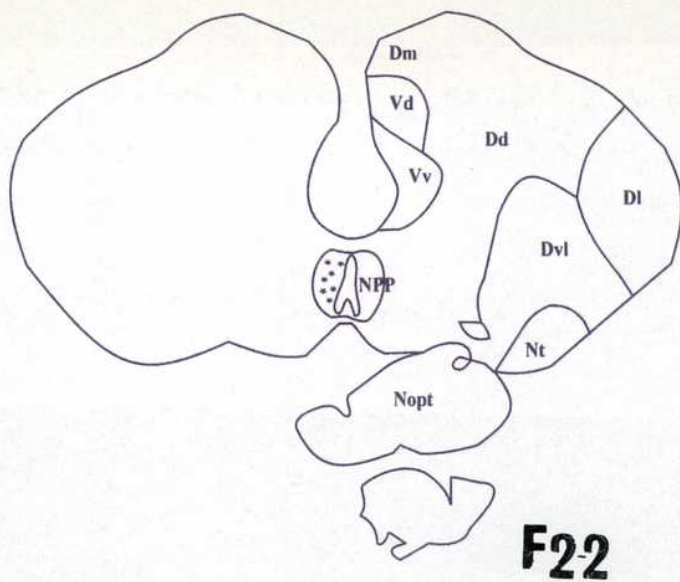
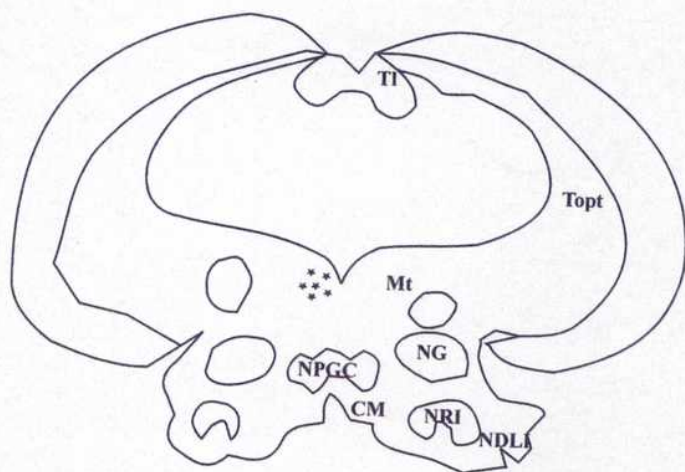


Figura 2-3: Esquema que representa un corte transversal del cerebro de pejerrey a la altura del mesencéfalo. Las estrellas representan las neuronas ir-GnRH, localizadas ventralmente al acueducto del mesencéfalo.

Foto 5: Neuronas ir-GnRH localizadas ventralmente al acueducto del mesencéfalo (A: 250×). Antisuero PBL#49.



F2-3

F5

II-IV Discusión

Con el fin de caracterizar la distribución neuroanatómica de las neuronas y fibras ir-GnRH en el pejerrey, se realizó un análisis inmunocitoquímico de cortes seriados tanto sagitales como transversales de cerebro de individuos adultos. Para ello se utilizaron antisueros elevados contra las distintas variantes sintéticas (Tabla 2-1). PBL#49, anti-sGnRH#2, y s1668 fueron generados contra sGnRH. Como se dijera anteriormente (ver Capítulo I), PBL#49 tiene alta reactividad cruzada contra las distintas variantes ensayadas y aún con la nueva variante descrita en los extractos cerebral e hipofisiario de pejerrey; sin embargo, el antisuero sGnRH#2 y s1668, son prácticamente específicos para sGnRH y tienen muy baja reactividad con el resto de las variantes. El antisuero cII741 es altamente específico para cGnRH-II mientras que el anticuerpo monoclonal LRH13 reconoce fundamentalmente los aminoácidos 4 y 5 (His-Tyr) de distintas variantes (Park & Wakabayashi, 1986).

En la Figura 2-4 se muestra una representación esquemática de la distribución de las células y fibras ir-GnRH en una sección parasagital. Los antisueros PBL#49, anti-sGnRH#2, y cII741 revelan tres núcleos ir-GnRH: el NOR, NPP y el tegmentum dorsal mesencefálico.

El NOR se describió por primera vez como ir-GnRH por Münz y col. (1981) en la *Xiphophorus maculatus*. Posteriormente, su presencia se describió en todos aquellos peces teleósteos con bulbos olfatorios que carecen de pedúnculos olfatorios (Nuñez-Rodríguez *et al.*, 1985; Grober *et al.*, 1987; Batten, 1990; Breuckmann *et al.*, 1996; Oka & Ichikawa, 1990). En aquellos teleósteos con bulbos olfatorios conectados al telencéfalo por medio de pedúnculos olfatorios, las neuronas ir-GnRH se disponen a lo largo del tracto olfatorio (Kah, *et al.*, 1986; Subhedar & Krishna, 1988; Amano *et al.*, 1991). Hoy se considera que el NOR corresponde al ganglio del nervio terminal (Münz *et al.*, 1982).

El NOR está conectado con la periferia sensorial, particularmente con el epitelio olfatorio (Breuckmann *et al.*, 1996; Demski & Northcutt, 1983; Grober *et al.*, 87; Subhedar & Krishna, 1988; Kudo *et al.*, 1994) y con la retina (Breuckmann

et al., 1996; Münz *et al.*, 1981; Demski & Northcutt, 1983; Uchiyama; 1990). Las conexiones entre el NOR y la periferia sensorial, así como el alcance de fibras provenientes de este núcleo a otras áreas cerebrales (tectum óptico, partes del telencéfalo y del hipotálamo) podrían sugerir que el NOR estaría involucrado en la integración de "inputs" sensoriales con las funciones reproductivas (Breuckmann *et al.*, 1996).

En el pejerrey, las fibras ir-GnRH provenientes del núcleo NOR se disponen caudalmente invadiendo la región medio-ventral del telencéfalo, y en el diencéfalo incluyen el NPP correspondiente al área preóptica. Debido a las técnicas utilizadas, es difícil discernir, en este caso, el origen de las fibras ir-GnRH provenientes de cada núcleo, pero parecen claramente conectados.

Es importante resaltar, que un tracto importante de fibras ir-GnRH provenientes del NPP discurren por el hipotálamo alcanzando la adenohipófisis, lo que sugeriría que este núcleo estaría relacionado directamente con la secreción de gonadotropinas y otras hormonas hipofisarias (ver Capítulo III). En distintas especies distintas evidencias sugieren que este núcleo es el encargado de la regulación de la actividad adenohipofisaria:

1. se ha demostrado que lesionando el área preóptica desaparecen las fibras ir-GnRH en la glándula hipófisis de *Carassius auratus*, (Kah *et al.*, 1986; Yamamoto *et al.*, 1998a).

2. Anglade *et al.*, 1993 demostraron el transporte directo de marcadores fluorescentes desde la neurohipófisis hacia el NPP, sugiriendo un transporte axonal directo de GnRH hacia la hipófisis.

3. Se ha descrito la presencia de receptores para esteroides gonadales en el NPP (Kim *et al.*, 1979; Anglade *et al.*, 1994).

4. En algunas especies, las neuronas ir-GnRH localizadas en esta región comienzan a hacerse evidentes recién en la madurez sexual (Magliulio-Cepriano *et al.*, 1994; Breuckmann *et al.*, 1996).

5. El tamaño y cantidad de neuronas ir-GnRH en el área preóptica es mayor en individuos sexualmente maduros que en juveniles (Grober *et al.*, 1994)

Como en el caso del pejerrey, otros autores también describieron neuronas entre el NOR y el NPP (Amano *et al.*, 1991; Batten *et al.*, 1990; Breuckmann *et al.*, 1996; Kah *et al.*, 1986; Subhedar & Krishna, 1988; Kudo *et al.*, 1994) Posiblemente, éstas neuronas se originen de la migración de neuronas desde la

placoda olfatoria hacia el área preóptica durante la ontogénesis de éste sistema (Schwanzel-Fukuda & Pfaff, 1991; Chiba *et al.*, 1994).

Además de estos tres núcleos, en otras especies se inmunodectaron neuronas ir-GnRH en el hipotálamo (Gothilf *et al.*, 1996; Kah *et al.*, 1986; Leprête *et al.*, 1993; Montero *et al.*, 1994; Zanderbergen *et al.*, 1995;). Sin embargo, en el pejerrey, con ninguno de los antisueros utilizados se inmunodetectaron otros núcleos, además de los anteriormente mencionados.

Tanto LRH13 como s1668 reconocen los cuerpos neuronales ubicados en el NOR y el NPP pero no aquellos localizados en la región mesencefálica. Debido a que LRH13 tiene baja reactividad contra cGnRH-II en técnicas inmunocitoquímicas (Park & Wakabayashi, 1986), que al menos en radioinmunoensayo s1668 presenta muy baja inmunoreactividad contra cGnRH-II (< 0.01%, J.A. King) y que estos cuerpos neuronales expresan cGnRH-II en todas las especies de cGnRH-II estudiadas hasta el momento (Kah *et al.*, 1986; Lêprete *et al.*, 1993; Montero *et al.*, 1994; Zanderbergen *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1995; White *et al.*, 1995; Gothilf *et al.*, 1996) esto resultados sugieren que las neuronas localizadas en este área cerebral expresarian cGnRH-II.

Los últimos autores mencionados determinaron que este núcleo ir-GnRH correspondía al núcleo *fasciculosus longitudinalis medialis* (Nflm), debido a su ubicación caudal a la comisura posterior y rostral al núcleo oculomotorius, y por el tamaño de sus neuronas (entre 30 y 40µm de diámetro), sin embargo, recientemente, Yamamoto *et al.* (1998b), demostraron que se trata de un grupo neuronal independiente del Nflm.

En los últimos años, se describió por medio de clonado del cDNA codificante para las distintas variantes de GnRH e hibridación *in situ*, que estos tres núcleos expresan distintas variantes de GnRH en varias especies de peces teleósteos. De esta forma en distintas especies de peces teleósteos: *Haplochromis burtoni* (White *et al.*, 1995), *Spaurus aurata* (Gothilf *et al.*, 1996), *Pagrus major* (Okuzawa *et al.*, 1996), *Oryzias latipes* (Parhar *et al.*, 1998a), *Oreochomis mossambicus* (Parhar, 1997) y *Oreochromis niloticus* (Parhar *et al.*, 1998b) las neuronas localizadas en el NOR expresan sGnRH, las del área preóptica sbGnRH y aquellas localizadas en la región mesencefálica cGnRH-II.

Esta expresión diferencial podría deberse a orígenes embriológicos distintos. En este sentido, el estudio de la ontogenia de la expresión de variantes

moleculares de GnRH en la tilapia *Oreochromis mossambicus* (Parhar, 1997) muestra que: las células ir-GnRH del NOR se originan en la placoda olfatoria, las neuronas del cerebro medio se originan del epéndima ventricular y las neuronas del área preóptica se originan del piso del área del telencéfalo basal y área preóptica anterior (Parhar, 1997). La expresión de tres variantes en tres núcleos cerebrales distintos con distinto origen embriológico, permitirá replantear nuevamente la hipótesis de Muske (1997) acerca de dos sistemas GnRHérgicos con dos orígenes embriológicos distintos. White y col. (1998b) han propuesto un árbol filogenético (Fig 1-3, Capítulo 1), demostrando la existencia de estos tres grupos evolutivos de GnRH divididos por su localización neuroanatómica: el grupo GnRH-I localizadas en áreas hipotalámicas y relacionadas con la liberación de gonadotrofinas, el grupo GnRH-II localizadas en el núcleo del cerebro medio y el grupo-III localizadas en el telencéfalo. Hasta el momento, sólo se especula acerca de los roles fisiológicos de los grupos II y III (Parhar, 1997).

En el pejerrey, la presencia de tres variantes de GnRH y la inmunodetección de tres núcleos cerebrales nos hace hipotetizar que en esta especie, como en otros Acanthopteros, sGnRH se expresaría en neuronas localizadas en el NOR, cGnRH-II en la región mesencefálica mientras que la tercer variante sería expresada por las neuronas localizadas en el área preóptica.

Sin embargo, como se detalla en la Figura 2-4, los antisueros utilizados, revelaron esquemas de expresión similares en cuanto a la distribución de neuronas y fibras ir-GnRH en el NOR y el NPP. Esto puede deberse a dos razones:

1. Los cuerpos neuronales anteriores expresan las dos variantes de GnRH (sGnRH y la nueva variante).

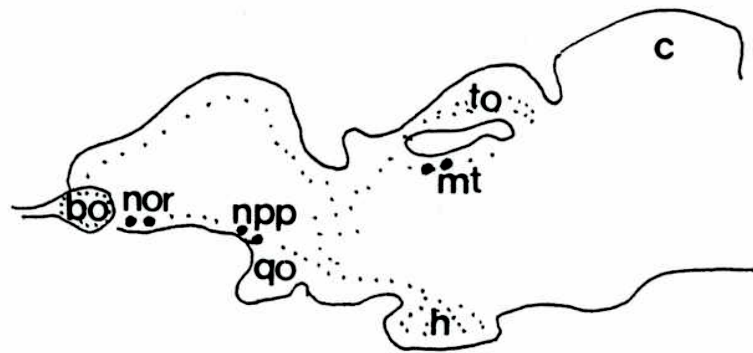
2. El comportamiento de los antisueros frente a antígenos fijados a una superficie (inmunocitoquímica) no es el mismo que a los que se encuentran libres en solución (radioinmunoanálisis). Este último hecho explicaría los resultados obtenidos en *Haplocromis burtoni*, en donde las células del área preóptica que eran inmunorreactivas a sGnRH cuando reveladas por inmunocitoquímica, expresan sbGnRH como se demostró posteriormente por clonado y secuenciación del cDNA codificante para sbGnRH e hibridación *in situ* (White *et al*, 1994; White *et al*; 1995).

En nuestro caso, el uso de preadsorciones con distintas variantes sintéticas de GnRH no ha dado resultados concluyentes con respecto a la distribución

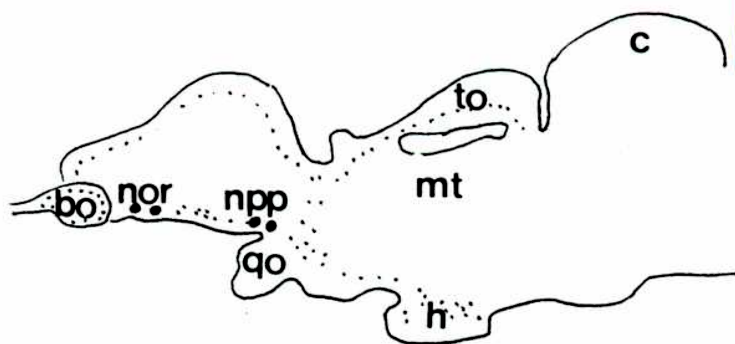
diferencial de al menos dos de las tres variantes en extractos cerebrales de pejerrey. La presencia de una única variante en extractos hipofisarios (Capítulo 1) sugiere que ésta se expresa en el área preóptica y consecuentemente se encontraría relacionada con la regulación de la síntesis y secreción de gonadotrofinas hipofisarias.

Figura 2-4: Esquema que representa la distribución de fibras (líneas) y neuronas (círculos) ir-GnRH en el cerebro del pejerrey.

PBL#49
sGnRH#2
cII741



LRH13
S1668



FCE y N BIBLIOTECA

Capítulo III: Relación entre GnRH y las células hipofisarias productoras de prolactina (PRL) y la hormona de crecimiento (GH).

III-I: Introducción

III-Ia: Anatomía del eje hipotálamo-hipofisario en peces teleósteos

La hipófisis en peces teleósteos presenta tres lóbulos bien diferenciados anatómicamente: la *pars distalis rostralis* (RPD), la *pars distalis proximalis* (PPD) y el lóbulo neurointermedio (NL), conformado por *pars intermedia* (PI) con la interdigitación e inervación hipotalámica que conforman la neurohipófisis caudal, considerada homóloga al lóbulo neural de vertebrados tetrápodos. Tanto la RPD como la PPD se encuentran también inervadas por terminales hipotalámicos que conforman la denominada neurohipófisis anterior, homóloga a la eminencia media de vertebrados tetrápodos (Peter *et al.*, 1990, Anglade *et al.*, 1993; Gorbman, 1995).

En todos los casos descritos (Siegmund *et al.*, 1987; Batten, 1986; Cambré *et al.*; 1986; Vissio *et al.*, 1996; 1997a; Yan & Thomas, 1991), las células secretoras de prolactina (PRL) se localizan en la RPD, las células corticotrópicas (ACTH) en el límite de la RPD y PPD o en el borde de RPD y la neurohipófisis anterior. Las células tirotrópicas (TSH) se distribuyen aisladamente en la RPD y PPD. La PPD contiene principalmente gonadotropos (GtHs) y somatotropos (GH). Mientras que en PI se describió la presencia de células productoras de hormona melanocito estimulante (MSH) y somatolactina (SL).

En el pejerrey, el patrón de distribución de las células adenohipofisarias es similar al descrito en otros teleósteos. Las células secretoras de PRL se distribuyen en el borde externo de la RPD, las células somatotropas se localizan fundamentalmente en la PPD, en estrecho contacto con la neurohipófisis anterior, las células gonadotrópicas se distribuyen en PPD y en el borde externo de la PI, mientras que las células que secretan SL se localizan exclusivamente en la PI (Vissio *et al.*, 1997a).

Como se dijera más arriba, la adenohipófisis en peces teleósteos está directamente inervada por fibras hipotalámicas neurosecretoras, caso único entre los vertebrados. Las neurohormonas producidas por éstas fibras son liberadas en las proximidades de las células adenohipofisarias, es decir, que no se transportan por un sistema portal hipotalámico-hipofisario (Anglade *et al.*, 1993; Peter *et al.*, 1990; Pierantoni & Fasano, 1991).

Varios autores describieron la vascularización de la adenohipófisis en teleósteos (Peter *et al.*, 1983; Batten *et al.*, 1987). Tanto la adeno como la neurohipófisis se encuentran irrigadas por la arteria hipofisaria anterior. Esta, forma un primer plexo capilar en el tejido neurohipofisario y desde allí un segundo sistema de capilares pasa hacia la adenohipófisis irrigando las células adenohipofisarias lo que supone un sistema porta-hipofisario vestigial. La sangre del segundo plexo drena hacia un sistema venoso, el cual confluye en una vena que sale de la hipófisis. Sin embargo no se han descrito terminales neurosecretorios en el primer plexo capilar de manera que la liberación de las neurohormonas en la adenohipófisis tendría su origen exclusivamente en los terminales neurosecretorios que interdigitan el tejido adenohipofisario (Peter *et al.*, 1990).

Los terminales neurosecretorios, están separadas de las células endócrinas por una membrana basal, pudiendo aquellas atravesar la membrana basal para conectarse directamente con las células adenohipofisarias (una situación similar a la encontrada en una sinapsis nerviosa). Las fibras que secretan los distintos neuropéptidos no están libremente distribuidas en la adenohipófisis sino que se localizan en la hipófisis en asociación directa con las células hipofisarias-blancas. En este sentido es lógico encontrar un contacto directo entre un tipo celular particular y las fibras neurosecretoras involucradas en la regulación de este tipo celular, como por ejemplo las fibras GnRHérgicas y las células gonadotropas en el goldfish (Kah *et al.*, 1986).

Es importante destacar que este tipo de inervación directa, provee un modelo único para el estudio sobre la anatomía funcional del sistema neuroendócrino en vertebrados ya que permite la localización de las distintas áreas cerebrales que se encuentran relacionadas con la regulación de la secreción hipofisaria ya que permiten el uso de técnicas de "tracing" retrógrado (Anglade *et al.*, 1993) muy dificultoso en

aquellos animales con sistema porta-hipofisario. Todo esto nos lleva a pensar que la asociación de un determinado tipo de fibra hipotalámica con un tipo celular hipofisario sugeriría que este neurotransmisor o neuropéptido ejerce una acción fisiológica sobre la o las células endócrinas en estudio. En este sentido éste mismo tipo de razonamiento es válido para todos los neuropéptidos y neurotransmisores liberados por los terminales nerviosos que inervan la hipófisis anterior en peces teleósteos (Peter *et al.*, 1990; Kah *et al.*, 1993; Trudeau, 1997).

III-I-b Acciones de GnRH en peces teleósteos

Los peces teleósteos, como la mayoría de los vertebrados, expresan múltiples formas de GnRH en su sistema nervioso central que difieren en su distribución neuroanatómica (Capítulo II), de esta forma resulta lógico pensar que la presencia de múltiples variantes de esta neurohormona y su distribución neuroanatómica diferencial, implicaría que cada una de estas variantes cumplen funciones fisiológicas diferentes.

La función clásicamente asignada a GnRH, de la cual deriva su nombre, es estimular la síntesis y secreción de las gonadotrofinas hipofisarias, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). Estas hormonas son glicoproteínas y conforman una familia junto con la hormona estimulante de hormonas tiroideas (TSH), y la gonadotrofina coriónica de origen placentario (CG). Los miembros de esta familia son heterodímeros compuestos por dos subunidades α y β . En mamíferos, las gonadotrofinas son liberadas a la circulación sistémica y regulan la esteroidogénesis gonadal y la maduración de las gametas; LH estimula la ovulación y la formación del cuerpo luteo en las hembras y la secreción de andrógenos en los machos, mientras que FSH estimula el crecimiento y la maduración de los folículos ováricos en hembras y la espermatogénesis en machos (Conn, 1994). Brevemente, el control GnRHérgico de la secreción de gonadotrofinas se produce a través de la activación de receptores (GnRH-R) en la membrana plasmática de los gonadotropos. Los GnRH-R tienen siete dominios hidrofóbicos trans-membrana característicos de los receptores acoplados a

proteína G. Esta proteína está asociada a la folipasa C- β , la que promueve el *turn-over* de fosfolípidos y la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (InsP₃) y diacylglicerol (DAG). La unión de InsP₃ a sus receptores intracelulares, induce la liberación de Ca²⁺ que conjuntamente con el DAG promueven la activación de la proteína kinasa C (PKC). Esta cascada de eventos intracelulares controlan la síntesis y secreción de las gonadotrofinas (Stojilkovic & Catt, 1995).

Los recientes avances en endocrinología de la reproducción en peces teleósteos, desarrollados principalmente en salmónidos, han demostrado claramente que el control hipofisario sobre la gametogénesis involucra también dos hormonas gonadotróficas: GtH-I y GtH-II (Tanaka *et al.*, 1993; Koide *et al.*, 1993; Okada *et al.*, 1994, García Hernandez *et al.*, 1997; Elizur *et al.*, 1996, Yoshiura *et al.*, 1997). Inclusive, hay autores que sugieren adoptar la nomenclatura que se utiliza en todos los vertebrados para denominar a estas gonadotrofinas: FSH y LH para GtH-I y GtH-II respectivamente (Swanson & Dittman, 1997). GtH-I es secretada durante todo el ciclo sexual por lo que se la considera la principal responsable de la gametogénesis; mientras que GtH-II es la responsable de la producción de esteroides que actúan sobre la maduración final de las gónadas (Prat *et al.*, 1996). Sin embargo quedan aún varios aspectos por resolver: existen especies donde sólo se encontró una gonadotrofina con características similares a GtH-II (Shulz *et al.*, 1995), sólo recientemente se describió que GtH-I estimula la esteroidogénesis gonadal (Quérat, 1994; Van der Kraak & Wade, 1996) y existe muy poca información sobre la regulación neuroendócrina de GtH-I (Govoroun *et al.*, 1998).

En salmónidos, se demostró la presencia de dos tipos de receptores para GtHs, denominados GtH-RI y GtH-RII (Yan *et al.*, 1992). GtH-RI presenta alta afinidad por ambas gonadotrofinas mientras que GtH-RII es altamente específico para GtH-II. Durante la vitelogénesis, GtH-I, interacciona con su receptor en las células de la teca y de la granulosa (Swanson 1991, Miwa *et al.*, 1994). Las células tecales, producen testosterona (T) la cual es aromatizada a estradiol-17 β (E₂) por las células de la granulosa (Nagahama, 1994). Los receptores para GtH-II no son detectables en la vitelogénesis. En la post-vitelogénesis/ período periovulatorio, cuando los niveles de GtH-I en plasma decrecen, los niveles de GtH-II alcanzan su nivel máximo (Swanson,

1991). GtH-II interacciona con su receptor en las células tecales estimulando la producción de 17α -hidroxiprogesterona. Esta, se convierte en 17α -hidroxi, 20β -dihidroprogesterona ($17,20\beta$ -P) por las células de la granulosa (Nagahama, 1994). En machos, el período de crecimiento gonadal está asociado a altos niveles GtH-I y su receptor, mientras que el período de espermiación está caracterizado por altos niveles de GtH-II. Se han descrito receptores a GtH-I en las células de Sertoli durante todos los estadios del desarrollo (Miwa *et al.*, 1994). Tanto GtH-I como GtH-II estimulan la secreción de los andrógenos T y 11-ketosterona (11KT) y de $17,20\beta$ -P de las células de Leydig (Planas & Swanson, 1995). Hacia el final de la esteroidogénesis, GtH-II se hace más potente en la secreción de esteroides testiculares.

El mecanismo de acción de sGnRH y cGnRH-II en la liberación de GtH-II ha sido intensamente estudiado en el goldfish, *Carassius auratus* por el grupo liderado por J.P. Chang. La acción de GnRH sobre los gonadotropos, está mediada por receptores de membrana de alta afinidad y baja capacidad. Tanto sGnRH como cGnRH-II compiten con similar afinidad por estos receptores.

El mecanismo intracelular desencadenado por la unión de sGnRH a su receptor es similar al descrito mamíferos (Chang *et al.*, 1993; 1994). Esta cascada de eventos involucra la fosfolipasa C (PLC), el aumento intracelular de Ca^{2+} y la activación de la protein-quinasa C (PKC). Esta última activa a su vez los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (VSCC) (Van-Goor *et al.*, 1994), y la entrada de Ca^{2+} extracelular, aumentando los niveles internos de Ca^{2+} . Este aumento de Ca^{2+} interacciona con la PKC que aumenta la liberación de GtH. Una liberación sostenida de GtH inducida por GnRH también es dependiente de la calmodulina (CaM) (Jobin *et al.*, 1996a). Otra vía que activa la liberación de GtH es la movilización de ácido araquidónico (AA) mediada por la fosfolipasa A_2 (PLA_2) (Chang *et al.*, 1996). Por otro lado, en otras especies como en *Clarias gariepinus*, *Channa punctatus* y *Oreochromis mossambicus*, GnRH estimula la producción de AMPc (van Asselt, 1989; Levavi-Sivan & Yaron, 1992; Mukhopadhyay *et al.*, 1995).

Como en el caso de sGnRH, cGnRH-II también estimula la liberación de GtH-II e involucra la activación de PLC, PKC y VSCC. Sin embargo, cGnRH-II no aumenta los niveles de $InsP_3$, esto conlleva a una falta de movilización del Ca^{2+}

intracelular (Chang *et al.* 1995). Probablemente otra PLC esté involucrada en la acción de cGnRH-II. Por otra parte, la acción de cGnRH-II tampoco involucra la cascada de AA.

¿Cómo se manifiestan estas diferencias en los mecanismos de acción de estas dos variantes?. De acuerdo a ensayos de radioreceptor tanto sGnRH como cGnRH-II se unen a la misma población de receptores (Chang *et al.*, 1996), esta hipótesis se ve reforzada por el reciente clonado de GnRH-R en goldfish y su activación por sGnRH y cGnRH-II (He *et al.*, 1997). De esta forma las evidencias sugieren que tanto sGnRH como cGnRH-II actúan a través del mismo receptor activando algunos mecanismos que son compartidos y algunos exclusivos, sin embargo los mecanismos por los cuales disparan distintas cascadas de segundos mensajeros son aún desconocidos (Chang *et al.*, 1997).

En peces teleósteos existen evidencias acerca de que GnRH además de regular la síntesis y secreción de las gonadotropinas regularía la síntesis y liberación de otras hormonas hipofisarias. Por ejemplo, se demostró acción liberadora de GnRH sobre GH en: *Carassius auratus* (Marchant *et al.*, 1989b; Marchant & Peter, 1989; Chang *et al.*, 1990a); *Cyprinus carpio* (Lin *et al.*, 1993a), híbridos de tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus* (Melamed *et al.*, 1995; 1996) y aunque aún discutida en *Oncorhynchus mykiss* en determinadas etapas del ciclo reproductivo (Holloway & Leatherland, 1997). Por otra parte existen claras evidencias sobre la presencia de receptores para GnRH en somatotropos de goldfish (Cook *et al.*, 1991) y una asociación morfológica de fibras ir-GnRH y este tipo celular en *Oncorhynchus mykiss* (Parhar & Munehico, 1994).

Como en el caso de la liberación de GtH-II la estimulación de GnRH en la secreción de GH depende del Ca^{2+} extracelular. GnRH activa la PKC, la cual estimula la entrada de Ca^{2+} extracelular por los canales VSCC. El aumento de Ca^{2+} intracelular interacciona posiblemente con la PKC aumentando la liberación de GH (Chang *et al.*, 1996). Por otra parte en esta misma especie GnRH no sólo estimula la liberación de GH sino también su síntesis (Mahmoud, *et al.*, 1996).

Como ya se dijera someramente más arriba, no se puede considerar que esta acción de GnRH sea general a todos los teleósteos. Este efecto es aún objeto de

discusión en la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Le Gac *et al.*, 1993; Blaise *et al.*, 1995) y no se ha demostrado en el *Clarias gariepinus* (Bosma *et al.*, 1997).

En todas las clases de vertebrados, se le atribuyen a GH una gran variedad de funciones que abarcan desde las clásicas acciones sobre el crecimiento y metabolismo (Rand Weaver *et al.*, 1993), osmorregulatorias (Sakamoto *et al.* 1997) hasta aquellas relacionadas con la reproducción (Le Gac *et al.*, 1993; Peter & Marchant, 1995). En algunos teleósteos, la tasa de crecimiento durante los primeros meses de vida influye sobre la edad en la que se alcanza la madurez sexual (Le Bail, 1988) y además modula la fecundidad en las hembras (Ivankov, 1983) y el tamaño de los ovocitos (Gjerde, 1986). Por otro lado, se describió que el crecimiento es modulado durante el ciclo sexual, se acelera durante el comienzo de la gametogénesis, y luego baja en el período de desove (Hunt *et al.*, 1982; Le Bail, 1988; Trudeau, 1997).

Otra de las hormonas hipofisarias posiblemente regulada por GnRH es PRL. Tanto GH como PRL son parte de una misma familia polipeptídica y parecen derivar de un mismo gen ancestral (Niall *et al.*, 1971; Rand Weaver, 1993). Ambas hormonas hipofisarias comparten además reguladores comunes: somatostatina, cortisol y responden a cambios en la presión osmótica (Bern, 1983; Nishioka *et al.*, 1988; Rand Weaver *et al.*, 1993; Sakamoto *et al.*, 1997).

Dada la relación de estas hormonas como el hecho de que GnRH estimula en algunos teleósteos la secreción de GH, es importante estudiar los efectos de GnRH sobre la secreción de PRL. Sin embargo, los efectos de GnRH sobre la secreción de PRL en los peces han recibido escasa atención, debido al hecho de que en forma general las fibras GnRHérgicas inervan la PPD y la PI, donde no se describe la presencia de lactotopos (Anderson *et al.*, 1995; Chiba *et al.*, 1996; Montero *et al.*, 1994; Moons *et al.*, 1994; Parhar & Munehico, 1994) y al hecho de que no se encontraron receptores a GnRH en células que expresan PRL (Cook *et al.*, 1991). En la rata, GnRH estimula la liberación de PRL por mediadores parácrinos secretados por las células gonadotropas (Andries & Deneff, 1995; Deneff & Andries, 1983; Lamberts *et al.*, 1989) estando esta acción mediada por angiotensina II (Saavedra, 1992; Becu-Villalobos *et al.*, 1994). La única evidencia acerca de una acción estimuladora de GnRH *in vitro* sobre la liberación de PRL desde la RPD en *Oreochromis mossambicus*

fue publicado por Weber y colaboradores (1997). En principio este efecto parecería no estar mediado por GtHs ya que como se explicara anteriormente, en peces teleósteos, los lactotrofos se disponen en la RPD y los gonadotrofos en la PPD (Bern *et al.*, 1975).

III-II: Objetivos

De acuerdo a los datos obtenidos en otras especies de peces teleósteos acerca de que GnRH estaría regulando la secreción de otras hormonas hipofisarias además de las gonadotrofinas, se investigó:

- 1) La asociación morfológica entre las fibras GnRHérgicas y las células secretoras de GH y PRL.
- 2) La presencia de receptores a GnRH en somatotrofos y lactotrofos.

III-III: Materiales y Métodos

III-IIIa Asociación morfológica entre fibras GnRHérgicas y las células secretoras de GH y PRL.

III-IIIa1: Procesamiento de las muestras

Se capturaron ejemplares adultos de ambos sexos capturados en la laguna Salada Grande, Partido de General Madariaga, Provincia de Buenos Aires como se detallara más arriba. Se removieron los cerebros junto con las hipófisis, previa fijación en una solución de paraformaldehído (4%), ácido pícrico (0.4%), en buffer fosfato salino (PBS, 0.05M, pH 7.4). Luego de un día de fijación, las muestras se almacenaron en solución de sacarosa (15%) en PBS, por 24hs a 4°C y posteriormente fueron criopreservados en solución criopreservadora (Watson *et al.*, 1986).

Una vez incluídas en O.C.T (Tissue-Tek Miles, USA Ojo el compuesto se llama O.C.T Tissue-Tek es la marca), las muestras fueron procesadas en crióstato a una temperatura de -20°C . Los cortes ($30\mu\text{m}$) se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados.

III-IIIa2:Doble inmunomarcación

La técnica inmunocitoquímica utilizada fue similar a la detallada en el Capítulo II. Resumidamente, los cortes se hidrataron en PBS-Tritón X 100 0.2% (PBS-T), tratados por 20 min. en suero normal de caballo e incubados con un anticuerpo primario (LRH13) durante toda la noche (ON) a 4°C . Al otro día, los cortes se incubaron con el primer anticuerpo secundario anti-mouse IgG (Sigma Chemicals). El complejo antígeno-anticuerpo fue visualizado por medio del método ABC (complejo avidina-biotina peroxidasa) (Vector Laboratories, Inc) y revelado con 0.03% de 3,3'diaminobenzidina (DAB) en buffer PBS y 0.04% H_2O_2 . Los cortes se lavaron con varios cambios de PBS-T antes de incubarlo con el segundo anticuerpo primario (anti-chum salmon *Oncorhynchus keta* PRL y anti-chum salmon GH) ON a 4°C (Tabla 3-1). Luego del lavado con PBS-T, se los incubó con el segundo anticuerpo secundario anti-conejo IgG (Sigma Chemicals) por 1hr, fueron lavados en PBS e incubados con el complejo ABC (Vector) por 1hr y revelados con 3-amino, 9-etil carbazol (AEC). Finalmente, los cortes se lavaron en agua destilada y se montaron con PBS-glicerina. El cromógeno DAB utilizado para visualizar el primer anticuerpo da una coloración marrón, mientras que el AEC utilizado para revelar el segundo antisuero primario da una coloración rojiza pudiendo ser fácilmente distinguibles entre sí. La especificidad de los antisueros fue validada mediante la preadsorción con los antígenos respectivos cuando se disponía de los mismos o por sustitución del antisuero primario por suero normal de caballo.

Anticuerpo	Dilución de trabajo	Generado en	Generado en	Provisto por
LRH 13	1:2000	Ratón	mGnRH	Dr. Wakabayashi, K.
Anti-Chum PRL	1:1000	Conejo	Chum salmon PRL	Dr. Kawauchi, H.
Anti-Chum GH	1:1000	Conejo	Chum salmon GH	Dr. Kawauchi, H.

Tabla 3-1: Características de los antisueros utilizados en la doble inmunomarcación

III-IIIb: Determinación de receptores a GnRH en somatotropos y lactotropos

III-IIIb1 Animales

Por cada experimento independiente (n=5) se utilizaron diecisiete individuos adultos de ambos sexos, criados en condiciones de cautiverio en la Estación Hidrobiológica de Chascomús, Ministerio de Asuntos Agrarios, Chascomús, Provincia de Buenos Aires. Los animales se transportaron al laboratorio en bolsas de polietileno, en donde fueron decapitados para la extracción de las hipófisis.

III-IIIb2 Cultivo primario de células hipofisarias

Una vez removidas las hipófisis, las mismas fueron colocadas en cápsula de Petri (35mm) en medio de disociación (o de cultivo) Leibovitz (L-15) (Sigma Chemicals) adicionado con NaHCO₃ (Sigma Chemicals, 26mM); Penicilina/Streptomycin (Gibco, BRL; 50 U.I./ml.) en donde se procedió a la

disociación mecánica de las mismas con tijeras estériles. Las porciones de tejido se transfirieron a un tubo del tipo Falcon (15 ml.) con 10 ml. PBS potásico estéril ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 10mM, ClNa 0.15M, pH 7.4) y se dejaron decantar. Posteriormente, se removió el PBS y se resuspendió el tejido hasta un volumen de 2 ml. con el mismo buffer. La disociación enzimática se utilizó 50 μl de una solución 20% (w/v) de D-Glucosa (Sigma Chemicals) y 400 μl de una solución de Tripsina (Gibco-BRL) 0.5% (v/v) por 20 min.. a 25°C. La reacción se detuvo con el agregado de 8 ml. de medio de disociación suplementado con suero normal de caballo (Gibco-BRL) (5%). La suspensión celular se obtuvo por medio de la trituración con pipeta Pasteur especialmente afinada a fuego. Una vez que se obtuvo una suspensión densa de células, se resuspendieron en 8 ml. con medio de cultivo y se centrifugó por 8 min. a 1500 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 12 ml. de medio de cultivo.

La suspensión celular, se sembró (1 ml.) en distintas condiciones y por duplicado en multiplacas de 24 placas con una densidad aproximada de 4000 células viables según el test de Trypan-Blue, por placa.

Las células se incubaron por una hora a 25°C, 5% de CO_2 para permitir la adhesión de las células al sustrato, después de lo cual se les agregó 1 ml. de medio de cultivo, e inmediatamente se colocaron nuevamente en la incubadora.

Las condiciones de siembra analizadas fueron las siguientes:

a) sobre cubreobjetos de vidrio de 12mm de diámetro (Eric-Scientific) pretratados con poli-L-lisina (PLL) (Sigma Chemicals)

b) sobre cubreobjetos de vidrio pretratados con polietilenimina (PEI) (Sigma Chemicals)

c) sobre cubreobjetos de vidrio directamente

d) directamente sobre la placa

e) sobre la placa pretratada con PLL

f) sobre la placa pretratada con PEI

En las seis condiciones, la tasa de sobrevivencia de las células hacia las cinco horas, fue buena. Al día siguiente, la tasa de sobrevivencia para las condiciones sin cubreobjeto fue muy baja, mientras que para las condiciones con cubreobjeto siguió

siendo muy buena, sin presentar diferencias entre ellas. Con lo cual los experimentos siempre se repitieron en la condición c.

Antes de realizar los ensayos de localización de receptores e identificación celular por inmunocitoquímica, las células se incubaron una noche en condiciones de humedad saturante, CO₂ 5%, y 25 °C. Esta temperatura de incubación fue escogida debido a que similar a la informada por diversos autores como la temperatura óptima de cultivo de células hipofisarias en otros peces teleósteos (Bosma *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1990b; Ribeiro *et al.*, 1982).

III-IIIb3: Radioiodinación de busserelina

Se utilizó busserelina (Hoescht, Argentina gentilmente cedida por la Dra. Damasia Becú, IBYME, Buenos Aires) como ligando. La busserelina (GnRH-A) es un análogo superactivo de GnRH (D-Ser [Tbu]⁶, des-Gly-NH₂¹⁰)-GnRH-etilamida. Ensayos previos de saturación sobre homogenatos de hipofisis de pejerrey (n=10, 36mg) habían demostrado la factibilidad de utilizar este análogo ya que había presentado un K_d= 0.2058nM y una B_{max}= 1.227 fmol/mg de tejido.

El protocolo de marcación de busserelina fue similar al utilizado en la marcación de variantes de GnRH (Capítulo I) utilizando Cloramina-T en concentración limitante. Brevemente, el protocolo de marcación consistió en agregar 2mCi de ¹²⁵I, llevado a 5μl con buffer fosfato 0.5M (BF), a 2μg de GnRH-A diluída en 5μl de Acido Acético 0.1N. La reacción comenzó con el agregado de cloramina-T (Cl-T, Sigma Chemicals) (0.2μg en 10μl de BF 0.05M, pH 7.5) y dejando reaccionar durante 2 min. Para realizar una segunda reacción con la misma concentración de Cl-T durante otros 2 min. La reacción se detuvo por dilución agregando acetato de amonio 2mM pH=4.5. El producto de la reacción se sembró en una columna de Carboxi Metil Celulosa (Sigma Chemicals, 6 x 0.6 cm.). Luego de la elución con acetato de amonio 2mM, se aumentó la fuerza iónica, eluyendo a partir de la sexta fracción con acetato de amonio 100mM pH=4.5.

Todas las fracciones se recogieron en 150 μ l de acetato de amonio 2mM pH=4.5, BSA, 5% hasta un volumen final de 1,5 ml.. De cada fracción se tomaron 10 μ l para la determinación perfil de marcación en contador gamma.

III-IIIb4: Test de unión de GnRH-A a receptores GnRH de hipófisis de rata

Con el objeto de determinar aquellas fracciones de la elución de la columna que tuvieran mejor porcentaje de unión, se realizó un test de unión utilizando homogenatos de hipófisis de rata. De cada fracción del pico radioiodinado correspondiente al análogo superactivo se determinó unión máxima e inespecífica. Brevemente, los homogenatos se realizaron utilizando hipófisis de rata de 30 días de edad para preparar 5 tubos de incubación (3 para la unión máxima y 2 para la inespecífica) por cada fracción del eluido de la columna. Cada tubo contenía aproximadamente 0,35 mg de tejido (\approx 800 μ g de proteínas) en 300 μ l de buffer de incubación (Tris-HCl 10 mM, BSA 0.1%, ditiotretitol 1 mM). Los homogenatos fueron incubados durante 2 horas en baño de hielo luego del agregado de 100 μ l de con el agregado de I¹²⁵-GnRH-A (60.000-80.000 cpm) en un volumen total de 500 μ l. La unión inespecífica se realizó luego del agregado de 2×10^{-7} M de GnRH-A radioinerte. La reacción se detuvo por centrifugación a 13.000 rpm en microcentrífuga durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y la radioactividad medida en un contador gamma.

III-IIIb5 Localización de receptores a GnRH e identificación de las células somatotropas y lactotropas

El cultivo celular, luego de una incubación ON en las condiciones previamente indicadas, se lavó con 1 ml. de una solución salina balanceada (BSS: CaCl₂ 1mM; KCl 5.4mM; KH₂PO₄ 0.4mM; MgCl₂ 1mM; MgSO₄ 0.8mM, ClNa 0.14M; Na₂HPO₄, 1.3mM; D(+) galactosa 5mM; piruvato de Na 5mM, Hepes 5mM; pH:7.4) por 5 min.. El BBS fue luego removido y lavada con el mismo volumen de BBS fresca durante 20

min. Esta solución fue nuevamente descartada para incubar cada placa con ^{125}I -GnRH-A por 20 min. a temperatura ambiente (80000 cpm en un volumen de 1 ml. de BSS). Para la realización de los controles de unión inespecífica se agregó además un exceso de GnRH-A radioinerte (10 μM).

Las células fueron luego lavadas rápidamente cuatro veces con 1 ml. de BSS y fijadas con 1,5 ml. de 2% (w/v) de paraformaldehído y 2% (v/v) de glutaraldehído en PB, 0.1M, pH 7.4 durante 20 min., en baño de hielo. Se realizaron luego dos lavados de 5 min. cada uno; el primero con buffer fosfato (PB) 0.1M pH 7.4 y el segundo con 1 ml. de PBS 10mM (ClNa 0,15M) pH 7.4. Las células fueron incubadas con 1 ml. de PBS-BSA (0.5%) por 30 min. y se lavaron tres veces por 5 min. con 1 ml. de PBS/Triton X-100 (0.25%, v/v).

Para la posterior inmunomarcación, las células se incubaron con los siguientes antisueros: anti-chum PRL (1:1000) y anti-chum salmon GH (1:1000) por una hora a temperatura ambiente. Luego de lavar las células tres veces con PBS-Tritón X-100, se las incubó con el segundo anticuerpo IgG anti-conejo (Sigma Chemicals) por 1 hr., y lavados en PBS-Tritón X-100. El complejo antígeno-anticuerpo fue visualizado por medio del método ABC (complejo avidina-biotina peroxidasa) (Vector Laboratories) y revelados con 3-amino, 9-etil carbazol (AEC, Vector) en las concentraciones indicadas en los capítulos precedentes. La reacción se visualizó con un microscopio con haz de luz invertida. La especificidad de la inmunomarcación fue verificada, reemplazando el primer antisuero con suero normal de caballo.

Una vez finalizada la reacción inmunocitoquímica los cubreobjetos se dejaron secar al aire y en cuarto oscuro fueron cubiertos con emulsión nuclear NTB2 (Kodak) (1:1 en agua destilada) y se expusieron en cámaras oscuras a 4°C por una semana.

Los cubreobjetos se revelaron con 2,4 diamipholdiclorídrico (Aldrich) por 6 min. se lavaron con agua destilada durante 5 min. y fueron fijados con tisuftato de sodio (20%, v/v). Los autoradiogramas se montaron en PBS-glicerina (1:1) y se fotografiaron con un fotomicroscopio (Polyvar, Reichert) equipado con ópticas con contraste interdiferencial de Normanski (CIF)

III-IV: Resultados

Como se explicara anteriormente, el estudio de inervación de las fibras ir-GnRH a las células que expresan PRL y GH en el pejerrey, se realizó a través de la técnica de doble inmunomarcación utilizando el anticuerpo monoclonal LRH13 para evidenciar fibras GnRHérgicas y los anti-chum salmon PRL y anti-chum salmon GH para la identificación de las células hipofisarias que expresan ambas hormonas respectivamente. Utilizando técnicas inmunocitoquímicas, estos antisueros pueden distinguir tanto PRL como GH de pejerrey sin presentar reacción cruzada entre ambas hormonas ni con otras hormonas hipofisarias en esta especie (Vissio, *et al.*, 1997a).

LRH13 evidenció numerosas fibras GnRHérgicas que pasando por del tallo hipofisario, alcanzaron las tres áreas de la hipófisis anterior: *Pars Distalis Rostralis* (RPD), *Pars Distalis Proximalis* (PPD), y *Pars Intermedia* (PI) (Foto 6a).

En la RPD, anti-chum salmon PRL, marcó un grupo de células que expresan PRL (ir-PRL). La mayoría de ellas localizadas en un compacto grupo en la periferia de esta área. La doble inmunomarcación revela una asociación cercana entre las fibras ir-GnRH y estas células hipofisarias (Fotos 6b, c).

En pejerrey, como en otros peces teleósteos, la PPD se caracteriza por la presencia de células productoras de GH y GtHs (Vissio *et al.*, 1997a). En este caso, las células productoras de GH fueron inmunoreveladas (ir-GH) en esta zona. La doble inmunomarcación, revela también en este caso una clara asociación morfológica entre las fibras ir-GnRH y las células somatotropas que se localizan rodeando la neurohipófisis anterior (Fotos 6 d,e,f)

En vista de estas evidencias morfológicas sobre una posible inervación directa de células productoras de GH y PRL por fibras ir-GnRH se quiso verificar si estas células expresaban receptores para este neuropéptido. Con este fin, se realizó un cultivo primario de células hipofisarias de pejerrey con el objeto de localizar en células que expresan PRL y GH (caracterizadas por inmunocitoquímica), receptores a GnRH (utilizando ^{125}I -GnRH-A).

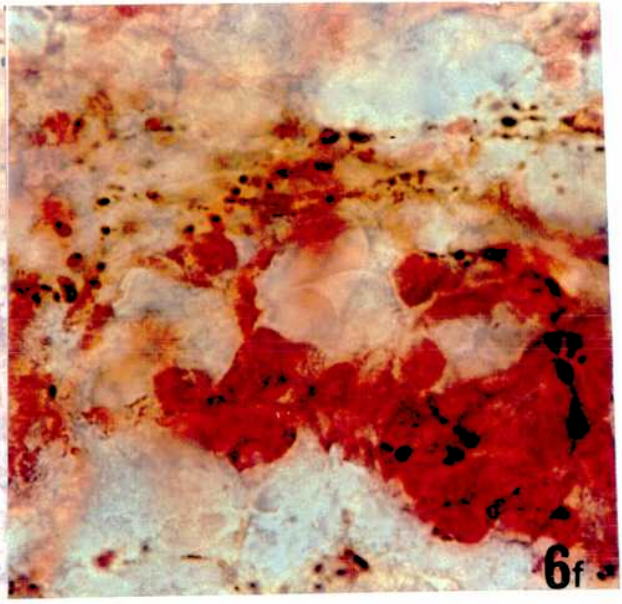
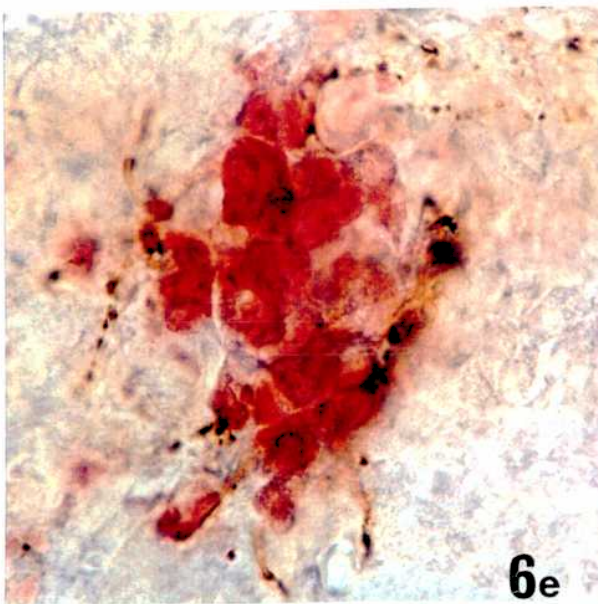
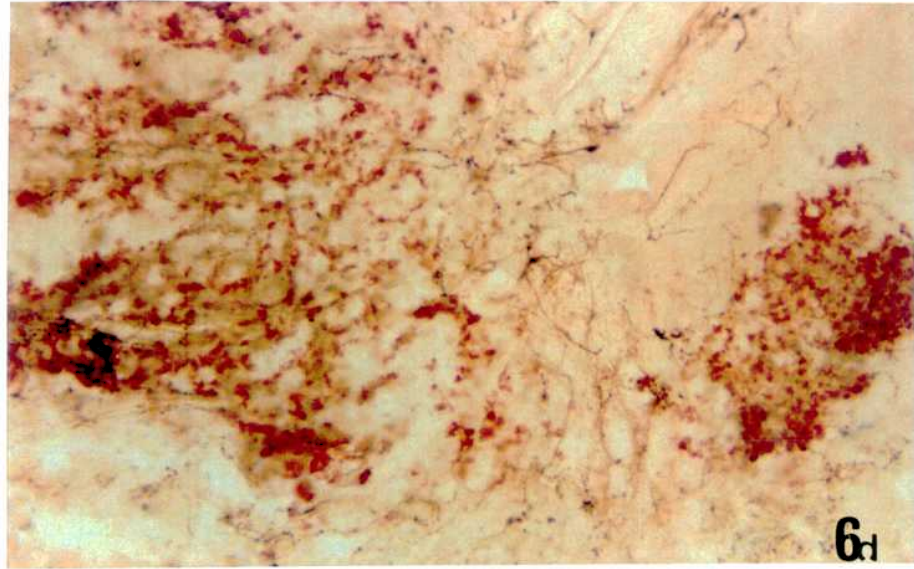
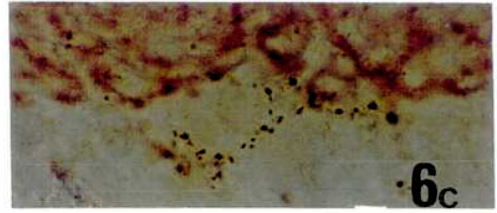
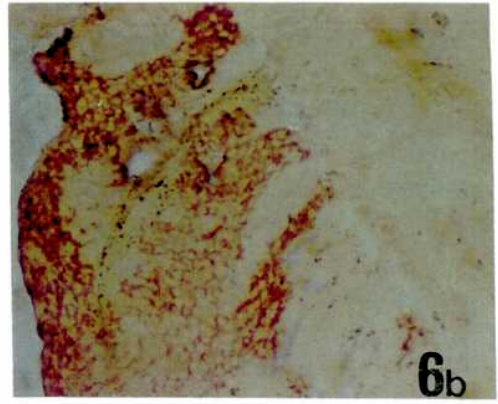
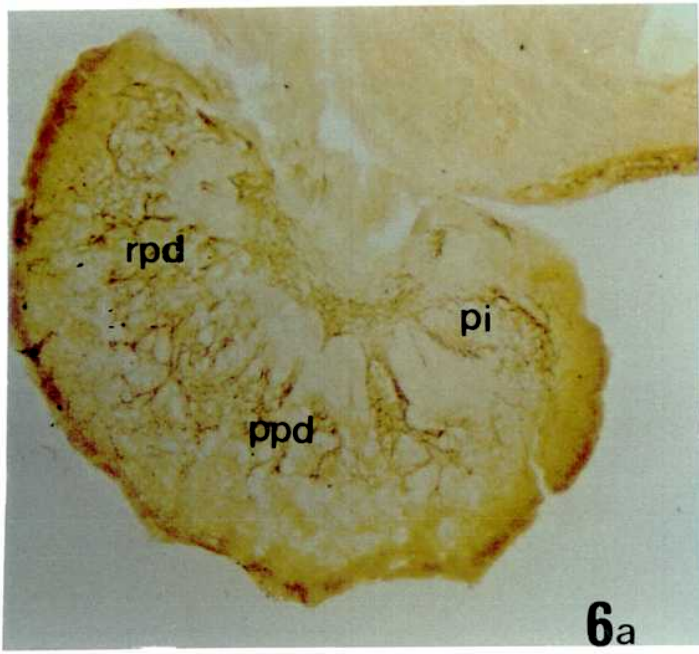
Por disociación mecánica y enzimática de las células hipofisarias de pejerrey, se obtuvieron 48000 células viables según el test de Trypan-Blue a partir de 17 hipófisis. Esta cifra representa más del 90% de células viables del total de las células

Foto 6a: Fibras ir-GnRH inervan las tres áreas de la hipófisis: RPD, PPD y PI (A:64×). Anticuerpo LRH13.

Foto 6b-c: Doble inmunomarcación que revela la asociación entre las fibras ir-GnRH (LRH13) y células prolactínicas (anti-chum PRL) en RPD (A:200×).

Foto 6d: Doble inmunomarcación de fibras ir-GnRH presentes en la neurohipófisis en íntimo contacto con las células somatotropas en PPD (A:100×). (Antisuero LRH13 y anti-chum GH).

Fotos 6e, f: Detalle de la asociación entre las fibras ir-GnRH y las células ir-GH en PPD. (A:600×).



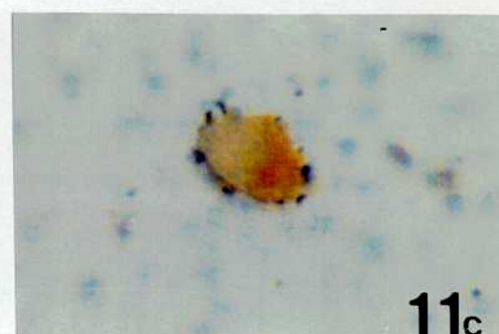
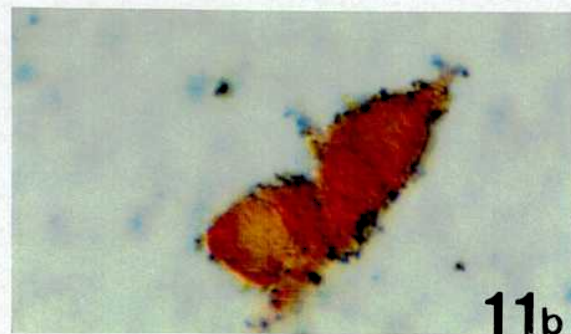
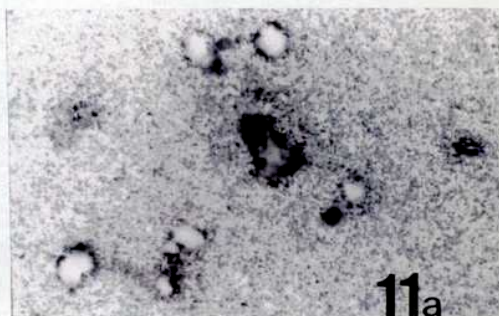
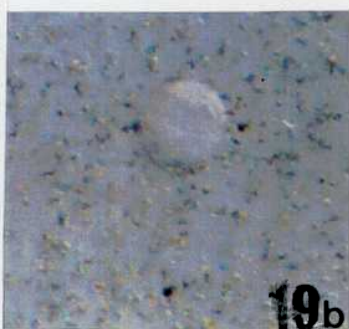
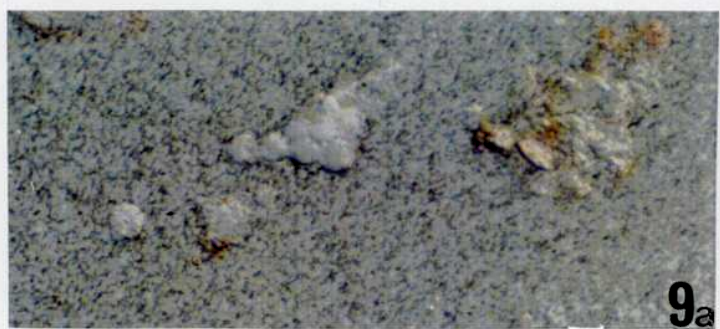
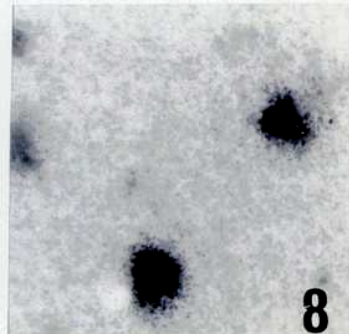
Fotos 7a, b: Célula ir-PRL en cultivo primario de hipófisis. Obsérvese el núcleo excéntrico y reniforme. (A: 1025×, CIF).

Foto 8: Localización autoradiográfica de ^{125}I -GnRH-A en cultivo primario de hipófisis. Células ir-PRL acumulan ^{125}I -GnRH-A. (A: 1025×).

Foto 9 a, b: Células incubadas con GnRH-A radioinerte. Obsérvese la desaparición de los gránulos de plata en las células. (A: 1025×).

Foto 10: Célula ir-GH en cultivo primario de hipófisis. (A: 1025×, CIF).

Foto 11a, b, c: Localización autoradiográfica de ^{125}I -GnRH-A en cultivo primario de hipófisis. Células ir-GH acumulan ^{125}I -GnRH-A. (A: 1025×).



disociadas. La viabilidad de las mismas se mantuvo en este nivel durante dos semanas. En nuestro caso no fue necesaria la utilización de placas tratadas con poli-L-lisina (PLL) o con polietilenimina (PEI), ya que estos tratamientos no mostraron diferencias tanto sobre la tasa de sobrevivencia como sobre la adhesión de las células al sustrato.

Las células hipofisarias ir-PRL presentaron las siguientes características:

1. Tamaño pequeño ($7.06 \pm 1.34\mu\text{m} \times 6.74 \pm 1.85\mu\text{m}$; $n=16$, rango 3.9-9 μm).
2. Núcleo reniforme de gran tamaño y de posición excéntrica (Foto 7a, b).

Las células ir-PRL acumulan granos de plata, revelando la presencia de receptores a GnRH (Foto 8). Los estudios de desplazamiento con GnRH-A radioinerte revelan la desaparición de los de los gránulos de plata demostrando la especificidad de la reacción (Foto 9a, b).

Las células hipofisarias ir-GH presentaron a su vez las siguientes características morfológicas:

1. Presentan mayor que las ir-PRL ($10,05 \pm 3.05\mu\text{m} \times 9.75 \pm 2.9\mu\text{m}$; $n=19$, rango 5.2-15.6 μm).
2. Son redondas, con núcleo en posición central (Foto 10).

Estas células también acumulan ^{125}I -GnRH-A, lo que permite inferir la presencia de receptores a GnRH (Foto 11a, b, c). La desaparición de la marca luego de la co-incubación con el ligando radioinerte reveló también la especificidad de unión del GnRH-A a sus receptores.

III-V Discusión

Sorprendentemente, en el pejerrey, las fibras hipotalámicas ir-GnRH que llegan a la hipófisis anterior inervan las tres áreas anatómicas de la misma: RPD, PPD y PI. En este sentido aunque en otras especies otros autores describieron presencia de fibras

GnRHérgicas proyectándose hacia la PPD y la PI (Anderson *et al.*, 1995; Chiba. *et al.*, 1996; Montero *et al.*, 1994, Moons *et al.*, 1989; Parhar & Munehico, 1994), esta es la primera evidencia de fibras GnRHérgicas que alcanzan la RPD en un pez teleósteo.

En el pejerrey, se observó además una clara asociación morfológica entre las fibras ir-GnRH y las células ir-PRL en la RPD lo que permitiría suponer una posible acción de GnRH sobre los lactotopos. Además se determinó por primera vez, la presencia de receptores a GnRH en este tipo celular.

En tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Perciformes), se determinó que GnRH puede inducir la liberación de PRL en fragmentos de la RPD *in vitro* (Weber *et al.*, 1997). En esta tilapia GnRH es capaz de estimular la liberación de dos formas de PRL (tPRL₁₇₇ y tPRL₁₈₈) tanto *in vivo* como *in vitro* (Weber *et al.*, 1997). A pesar que no se ha demostrado la presencia de receptores a GnRH en este tipo celular en esta especie, puede suponerse que se trata de un efecto directo.

En ratas, también se ha demostrado *in vitro* liberación de PRL inducida por GnRH (Denef & Andries, 1983; Lamberts *et al.*, 1989). Sin embargo posteriormente se demostró que este efecto es indirecto y se encuentra mediado por angiotensina II liberado por células gonadotropas (Saavedra, 1992, Becú-Villalobos *et al.*, 1994). Es importante recalcar que en mamíferos, las células que expresan PRL se hallan anatómicamente asociadas a las células gonadotropas (Sato, 1980). Sin embargo, este no es el caso descrito en peces teleósteos, en donde las células que expresan GtHs y las células secretoras de PRL están separadas anatómicamente. Las que secretan PRL se localizan en la RPD mientras que las células que productoras de GtH-I y II se localizan en la región posterior de la adenohipófisis (Cambré *et al.*, 1986; Yan *et al.*; 1991, Vissio *et al.*, 1997a).

Esta distribución sugiere que el efecto de GnRH sobre las células PRL no es mediado por la liberación parácrina de las células gonadotropas. En este sentido, a pesar de que no poseemos datos acerca de la acción de GnRH sobre la liberación de PRL en el pejerrey debido a la falta de un RIA específico, la asociación morfológica entre las fibras GnRHérgicas y las células lactotropas y la presencia de receptores de GnRH en células ir-PRL en esta especie sugieren por primera vez en un pez teleósteo, un efecto directo de este neuropéptido sobre los lactotopos.

Debido a la ausencia de receptores para GnRH en lactotopos en el goldfish (Cook *et al.*, 1991) y al efecto liberador de PRL de GnRH en tilapia, Weber y col. (1993) han sugerido que probablemente el efecto de GnRH sobre la liberación de PRL esté reducido a los grupos más evolucionados de peces teleósteos. A pesar de que esta aseveración puede resultar aventurada por haberse elaborado a partir de datos experimentales no equivalentes y obtenidos en sólo dos representantes de dos órdenes de peces teleósteos nuestros datos podrían reforzar esta línea de pensamiento. Tanto los Ateriniformes (pejerrey) como los Perciformes (tilapia) son órdenes de aparición tardía comparados con los Cipriniformes (goldfish).

En el pejerrey, las fibras GnRHérgicas también alcanzan las células somatotropas que se localizan bordeando la neurohipófisis en la PPD. Estas células también expresan receptores a GnRH.

La invasión de fibras ir-GnRH en células que expresan GH también ha sido observada por otros autores en otros teleósteos (Cook *et al.*, 1991; Parhar & Munehico, 1994). Hoy es bien conocida la acción estimuladora de GnRH sobre la secreción de GH en goldfish tanto *in vivo* como *in vitro* (Marchant *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1990a; Trudeau *et al.*, 1992); carpa (Lin *et al.*, 1993a); y tilapia (Melamed *et al.*, 1995) y la unión específica de sGnRH a los somatotropos en goldfish (Cook *et al.*, 1991). Además, el tratamiento con sGnRH estimula significativamente los niveles de ARN mensajero de GH en hipófisis de goldfish de manera dosis dependiente (Mahmoud *et al.*, 1996); sugiriendo que por lo menos, en el goldfish, GnRH se relaciona con la síntesis y secreción de GH.

Sin embargo, la acción directa de GnRH sobre la liberación de GH parece no ser un fenómeno general en los teleósteos. En otras especies como la trucha arco iris este efecto es aún objeto de debate (Le Gac *et al.*, 1993; Blaise *et al.*, 1995; Holloway & Leatherland, 1997) o en el bagre africano (Bosma *et al.*, 1997) en donde no se determinó la presencia de receptores a GnRH ni acción liberadora en este tipo celular.

Como se discutiera más arriba el efecto de GnRH sobre las células lactotropas, parecería limitarse a grupos de aparición más tardía, sin embargo en el caso de GH, este efecto se describió tanto en especies de aparición temprana (Cypriniformes) como en aquellas de aparición tardía (Perciformes).

La función más conocida de GH, en peces teleósteos, es estimular el crecimiento directamente o a través de factores de crecimiento (IGFs). El hígado, así como las branquias, intestino, riñón y gónadas tiene receptores a GH (Peter & Marchant, 1995). Por otro lado, se demostró que existe una relación entre el crecimiento y la reproducción en ciertos vertebrados y es particularmente evidente en algunos estadios del ciclo de vida de los peces (Trudeau, 1997). En salmónidos y otras especies de teleósteos, la tasa de crecimiento durante los primeros meses de vida, influye sobre la edad a la que ocurre madurez sexual, modula la fecundidad en las hembras y el tamaño de los huevos. En sentido contrario, el crecimiento es diferencial modulado durante el ciclo reproductivo, se acelera en el comienzo de la gametogénesis, y disminuye en la maduración y desove (Marchant & Peter, 1986; Trudeau *et al.*, 1991; Le Gac, *et al.*, 1993; Trudeau, 1997). En el goldfish, las variaciones estacionales en el tamaño gonadal se encuentran altamente correlacionadas con los niveles séricos de GtH-II y GH (Trudeau, 1997). Por ejemplo, los niveles séricos de GH se incrementan a medida que se incrementa el tamaño de las gónadas durante el invierno, cuando el crecimiento somático es bajo. Este hecho sugiere que GH puede ser importante en el control de la reproducción estacional en el goldfish. Por otro lado, esta relación entre crecimiento y reproducción podría explicarse por la regulación directa de GnRH sobre las células hipofisarias que expresan GH. Por otra parte, también se le atribuye a GH acciones osmoregulatorias (Sakamoto *et al.*, 1997).

En el pejerrey, GnRH se encuentra morfológicamente asociada con gonadotropos, como era de esperar y con células productoras de SL (Vissio *et al.*, 1997b; Vissio *et al.*, 1998). La SL es una hormona hipofisaria, aislada por primera vez a partir de hipófisis de un pez teleósteo, *Gadus morhua* (Rand-Weaver *et al.*, 1991). El rol fisiológico de la misma no ha sido determinado con precisión (maduración, regulación del calcio, respuesta al stress, regulación ácido-base; Kaneko, 1997), pero parece tener algunas acciones relacionadas con la reproducción y probablemente relacionadas con GnRH debido a que:


1. GnRH bloquea la acción inhibitoria de dopamina sobre la secreción de SL en cultivo primario de células hipofisarias de trucha arco iris (Kakisawa *et al.*, 1997).

2) Los niveles plasmáticos de SL varían a lo largo del ciclo sexual en dos especies de tilapia (Rand-Weaver *et al.*, 1992; Olivereau & Rand-Weaver, 1994).

3) Se demostró la presencia de fibras ir-GnRH próximas a las células que secretan SL en *Oreochromis mykiss* (Parhar & Munehico, 1994) y en pejerrey (Vissio *et al.*, 1997b).

4) Se determinó la presencia de receptores a GnRH en células ir-SL en cultivo primario de pejerrey (Vissio *et al.*, 1998).

En conclusión, la asociación morfológica de las fibras GnRHérgicas con distintos tipos celulares hipofisarios en el pejerrey (GtHs, PRL, GH y SL), y la presencia de receptores a este neuropéptido en estas células implicaría que GnRH no sólo estaría relacionada con la regulación de la secreción de las gonadotrofinas sino que tendría un rol más amplio en el control otras hormonas hipofisarias. En este sentido podría estar regulando hormonas cuyos efectos directa o indirectamente se relacionen con la reproducción.

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long vertical stroke at the bottom.A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lepa' followed by a long horizontal line extending to the right.

Bibliografía

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. (U.S.A.)* 83:179-183.

Akatsu, S., Takada, M., Ohki-Hamazaki, H., Murakami S., Arai, Y. (1992). Origin of luteinizing hormone –releasing hormone (LHRH) neurons in the chick embryo: effect of the olfactory placode ablation. *Neurosci. Lett.* 142:241-244.

Amano, J.P., Aida, K., Okumoto, N., & Hasegawa, Y. (1986). Changes in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in the brain and pituitary, and GTH contents in the ovulation. *Zool. Sci.* 9:375-386.

Amano, M., Oka, Y., Aida, K., Okumoto, N., Kawashima, S. & Hasegawa Y. (1991). Immunocytochemical demonstration of salmon GnRH and chicken GnRH-II in the brain of masu salmon, *Onchorhynchus masou*. *J. Comp. Neurol.* 314:587-597.

Amano, M., Aida, K., Okumoto, N., & Hasegawa Y. (1992). Changes in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in the brain and pituitary, and GTH contents in the pituitary in female Masu salmon, *Oncorhynchus masou*, from hatching through ovulation. *Zool. Sci.* 9:375-386.

Amores, A.; Force, A.; Yan, Y-L; Joly, L.; Ameniya, C.; Frits, A.; Ho, R.K.; Langeland, J.; Prince, V.; Westerfield, M.; Ekker, M. & Postlethwait, J.H. (1998). Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 282: 1711-1714.

Andersen, A.C.; Tonona, M.C., Pelletier, G., Conlon, J.M.; Fasolo, A. & vaudry, H. (1992). Neuropeptides in the amphibian brain. *Int. rev. Cytol* 138:89-210.

Anderson, E., Bogerd, J., Borg, B., Sharp, P.J., Sherwood, N.M. & Goos, H. (1995). Characterization and localization of gonadotropin-releasing hormone in the brain and pituitary of the three-spined stickleback, *Gasterouteus aculeatus*. *Cell Tissue Res.* 279:489-493.

Andries, M. & Denef, C. (1995). Gonadotropin-releasing hormone influences the release of prolactin and growth hormone from intact rat pituitary in vitro during a limited period of neonatal life. *Peptides* 3:527-532.

Anglade, I.; Zandbergen, T.; Kah, O. (1993). Origin of the pituitary innervation in the goldfish *Cell and Tissue Research.* 273:345-355.

Anglade, I.; Pakdel, F.; Bailhache, F.; Petit, F.; Salbert, P.; Valotaire, Y. & Kah, O. (1994). Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the brain of the rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *J. Comp. Neuroendocrinol.* 6:573-583.

Ashihara, M.; Suzuki, M., Kubokawa, J., Yoshiura, Y., Kibayashi, M., Urano, A. & Aida, K. (1995). Two different precursor genes for the salmon-type gonadotropin-releasing hormone exist in salmonids. *Journal of Molecular Endocrinology.* 15:1-9.

Ball, J.N. (1981) Hypothalamic control of the pars distalis in fishes, amphibians, and reptiles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44:135-170.

Ball, G.F. & Hahn T. (1997). GnRH neuronal systems in birds and their relation to the control of seasonal reproduction. En "GnRH neurons: Gene to behaviour". (ed. Por Parhar I.S. & Sakuma, Y.), pp 325-342. Brain Shuppan, Japan.

Batten, T.F.C. (1986). Immunocytochemical demonstration of pituitary cell types in the teleost *Poecilia latipinna*, by light and electron microscopy. *Gen Comp Endocrinol* 63: 139-154.

Batten, T.F.C., & Ingleton, P.M. (1987). The structure and function of the hypothalamus and pituitary gland. En: "Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology" (ed. por Chester-Jones, I., Ingleton, P.M., Phillips, J.G.) Plenum Press, N.Y., pp. 285-409.

Batten, T.F.C.; Cambre, L.; Moons, L. & Vandesande, F. (1990). Comparative distribution of neuropeptide-immunoreactive systems in the brain of the green molly, *Poecilia latipinna*. *J.Comp. Neurol.* 309:893-919.

Blaise O., Le Bail P.Y. & Weil C. (1995). Lack of gonadotropin-releasing hormone action on *in vivo* and *in vitro* growth hormone release, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. and Physiology C* 110:133-141.

Becú- Villalobos, D; Lacau-Mengido, I.M., Thyssen, S.M., Diaz-Torga, G.S. & Libertun, C. (1994). Effects of LHRH and ANGII on prolactin stimulation are mediated by hypothysial AT1 receptor subtype. *Am. J. Physiol.* 266 (Endocrinol. Metab. 29) 274-278.

Bennis, M., Dubourg, P., Gamrani, H., Calas, A. & Kah, O. (1989). Existence of a GnRH immunoreactive nucleus in the dorsal midbrain tegmentum of the chamaleon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75:195-203.

Bern, H.A. (1983). Functional evolution of prolactin and growth hormone in lower vertebrates. *Amer. Zool.* 23:663-671.

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

Bogerd, J., Zandbergen, T., Andersson, E. & Goos, H. (1994). Isolation, characterization and expression of cDNA encoding the catfish-type and chicken-II-type gonadotropin-releasing hormone precursors in the African catfish. *Eur. J. Biochem.* 222:541-549.

Bonetto, A. & Castello, H.. (1985). Pesca y piscicultura en aguas continentales de América Latina. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA), Washington D.C.

Boschi, E.E. & Fuster de Plaza, M.L. (1959). Estudio biológico pesquero del pejerrey del embalse de Rio Tercero (*Basilichthys bonariensis*). Departamenro de Investigaciones Pesqueras, Secretaría de Agricultura, Ganadería. Buenos Aires, Pub Nro 8, 61pág.

Bosma P.T., Kolk S.M., Rebers F.E.M., Lescroart O., Roelants I., Willems P.H.G.M. & Shulz R.W. (1997). Gonadotrophs but not somatotrophs carry gonadotropin-releasing hormone receptors: receptor localisation, intracellular calcium, and gonadotrophin and GH release.

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

Burgus, R., Butcher, M., Amoss, M., Ling, N., Monahan, M., Rivier, J., Fellows, R., Blackwell, R., Vale, W., & Guillemin, R. (1972). Primary structure of ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)* 69:278-282.

Cambré, M.L., Werdonck, W., Ollevier, F., Vandesande, F., Batten, T.F.C.& Kuhn, E.R. (1986). Immunocytochemical identification and localization of the different cells types in the pituitary of the seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 61:367-375.

Carosfeld, J., Powell, J.F.F., Park, M., Fischer, W.H., Craig, A.G., Chang, J.P., Rivier, J.E. & Sherwood, N.M. (1999). A novel form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in herring sheds lighty on evolutionary pressures. Enviado.

Chang, J.P., Yu, K.L., Wong, A.O.L. & Peter, R.E. (1990a). Differential actions of dopamine receptors subtypes on gonadotropin and growth hormone release *in vitro* in goldfish. *Neuroendocrinology.* 51: 661-674.

Chang, J.P., Cook, H., Freedman, G., Wiggs. A.J., Somoza, G.M., Leeuw, R., & Peter, R.E. (1990b). Use of pituitary cell dispersion method and primary culture system for the studies of gonadotropin-releasing hormone action in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77:256-273.

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

Chang, J.P., Van Goor, F., Wong, A.O.L., Jobin, R.M. & Neumann, C.M. (1994). Signal transduction pathways in GnRH-and dopamine D1-stimulated growth hormone secretion in the goldfish. *Chin. J. Physiol.* 37:111-127.

Chang, J.P., Garofalo, R., Neumann, C.M. (1995). Differences in the acute actions of sGnRH and cII GnRH on gonadotropin release in goldfish pituitary cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 100:339-354.

Chang, J.P., Van Goor, F., Jobin, R.M. & Lo, A. (1996). GnRH signaling in goldfish pituitary cells. *Biol Signals.* 5:70-80.

Chang, J.P.; Van Goor, F.; Lo, A.; Johnson, J.D.; Jobin, R.M. & goldberg, J.I. (1997). Signal transduction in gonadotropin (GtH)-II secretion in goldfish pituitary cells. En *Advances in Comparative Endocrinology*. Editado por Kawashima, S. & Kikuyama, S. Monduzzi Editore. Bologna. Italy, pp. 29-33

Chiba, A.; Oka, S. & Honna, Y. (1994). Ontogenetic development of gonadotropin-releasing hormone-like immunoreactive neurons in the brain of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Neurosci. Lett.* 178:51-54.

Chiba, A., Sohn, Y.S. & Honna, Y. (1996). Distribution of neuropeptide Y and gonadotropin-releasing hormone immunoreactivities in the brain and hypophysis of the Ayu, *Plecoglossus altivelis* (Teleostei). *Arch. Histol. Cytol.* 59 (2):137-148.

Chieffi, G., Pierantoni, R. & Fasano, S. (1991). Immunoreactive GnRH in hypothalamic and extrahypothalamic areas. *Int. Rev. Cyto.* 127:1-55.

Chow, M.M., Gothilf, Y. & Zohar, Y. (1995). Molecular characterization of the seabream gonadotropin-releasing hormone gene isolated from striped bass (*Morone saxatilis*). En: Goetz, F.; Thomas, P. (eds) *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Austin, TX; pp 72.

Conlon, J.M., Collin, F., Chiang, Y. C., Sower, S.A., & Vaudry, H. (1993). Two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone from the brain of the frog, *Rana ridibunda*: Purification, characterization, and distribution. *Endocrinology* 132:2117-2120.

Cook, H., Berkenbosch, J.W., Fernhout, M.J., Yu, K.L., Peter, R.E., Chang, J.P & Rivier. (1991). Demonstration of gonadotropin-releasing hormone receptors on gonadotrophs and somatotrophs of the goldfish: an electron microscope study. *Regul. Peptides* 36, 369-378.

Conn, P.M. (1994). The molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary. En: "The Physiology of Reproduction", segunda edición (ed. por Knobil, E. y Neill, J.D.) Raven Press, Ltd., New York.

D'Antonio, M.; Vallarino, M.; Lovejoy, D. A.; Vandensade, J.A.; King, J.A.; Pienatori, R. & Peter, R.E. (1995). Nature and distribution of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in the brain, and GnRH and GnRH binding activity in serum of the spotted dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 98:35-49 (1995).

Dellovade, T.L., King, J.A., Millar, R.P. & Rissman, E.F. (1993). Presence and differential distribution of distinct forms of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in the musk shrew brain. *Neuroendocrinology* 58:166-177.

Demski, L.S. & Northcutt, R.G. (1983). The terminal nerve: A new chemosensory system in vertebrates? *Science* 220:435-437.

Demski, L.S.; Beaver, J.A.; Sudberry, J.J.; Custis, J.R. (1997). GnRH systems in cartilaginous fishes. En "GnRH neurons: Gene to behaviour". (ed. Por Parhar I.S. & Sakuma, Y.), pp 123-143. *Brain Shuppan, Japan*.

Denef, C. & Andries, M. (1983). Evidence for paracrine interaction between gonadotrophs and lactotrophs in pituitary cell aggregates. *Endocrinology* 112:813-822.

Dores, R.M.; Rubin, D.A. & Quinn T.W. (1996). Is it possible to construct phylogenetic trees using polypeptide hormone sequences. *Gen. Comp. Endocrinol.* 103:1-12.

Dufour, S., Montero M., Le Belle, N., Bassonpierre M., King J.A., Millar R.P., Peter, R.E. & Fontaine Y.A. (1993). Differential distribution and response to experimental sexual maturation of two forms of brain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the European eel, *Anguilla anguilla*. *Fish Physiol. Biochem.* 11:99-106.

Dulka, J.G., Stacey, N.E., Sorensen P., W., Van der Kraak, G.J. & Marchant, T.A. (1987). A sex pheromone system in goldfish: Is the Nervus terminalis involved?. En: "The terminal nerve (*nervus terminalis*) structure, function and evolution (ed. Por Demski L.S. & Schwanzel-Fukuda M.), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 519:411-420.

Dunn, I.C., Chen, Y., Hook, C., Sharp, P.J. & Sang, H.M (1993). Characterization of the chicken preprogonadotropin-releasing hormone-I-gene. *J. Mol. Endocrinol.* 11:19-29.

Elizur, A., Zmopra, N., Rosenfeld, H., Meiri, I., Hassin, S., Gordin, H. & Zohar, Y. (1996). Gonadotropins β -GTH I and β -bGTH II from Gilthead seabream, *Spaurus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102:39-46.

Garcia Hernandez, M.P., Koide, Y., Diaz, M.V., Kawauchi, H. (1997). Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* (Risso, 1810). *Gen. Comp. Endocrinol.* 196:389-399.

Gautron, J.P., Pattou, E., Bauer, K., & Kordon, C. (1991). (Hydroxyproline⁹) luteinizing hormone-releasing hormone: a novel peptide in mammalian and frog hypothalamus. *Neurochem. Int.* 18:221-235.

- Gjerde, B. (1986). Growth and reproduction in fish and shellfish. *Aquaculture* 57:37-55.
- González Regalado, T. & Mastrarrigo, V. (1984). Piscicultura. El pejerrey. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Publicación Miscelánea N° 268: 1-53.
- Gorbman, A. (1995). Olfactory origin and evolution of the brain-pituitary endocrine system: facts and speculation. *Gen Comp Endocrinol* 97: 171-178
- Gothilf, Y., Chen, T.T. & Zohar, Y. (1993). Gonadotropin-releasing hormone gene(s) in stripped bass. Program Symposium on Advances in the Molecular Endocrinology of Fish, May 23-25, Toronto, Canada.
- Gothilf, Y.; Elizur, A. & Zohar, Y. (1995a). Three forms of gonadotropin-releasing hormone in the gilthead seabream and stripped bass: Physiological and molecular studies. En: Fifth International Symposium on reproductive Physiology of fish, Julio, 1995, Texas, USA.
- Gothilf, Y., Elizur, A., Chow, M., Chen, T.T. & Zohar, Y. (1995b). Molecular cloning and characterization of a novel gonadotropin-releasing hormone from the gilthead seabream (*Spaurus aurata*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4:27-35.
- Gothilf, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Sagrillo, C., Selmanoff, M., Chen, T., Kah, O., Elizur, A. & Zohar, Y. (1996). Three forms of gonadotropin-releasing hormone in perciform fish (*Spaurus aurata*): Complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. *Biology of Reproduction.* 55: 636-645.
- Govoroun, M.; Chyb, J. & Breton, B. (1998). GtH-I and GtH-II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary responsiveness to GnRH-A stimulation. *Gen Comp Endocrinol* 111: 38-50.
- Grober, M.S.; Bass, A.H.; Burd, G.; Marchaterre, M.A.; Segil, N.; Scholz, K.; & Hodgson, T. (1987). The nervus terminalis ganglion in *Anguilla rostrata*: An immunocytochemical and HRP histochemical analysis. *Brain Research.* 456:148-152.
- Grober, M.S., Bass, A. & Mayers, D. (1992). GnRH cDNA sequence for the sexually polymorphic teleost fish, *Trichthys nonatus*. *Soc. Neurosci.* 18:894 (Abstract).
- Grober, M. S., Myers, T. R., Marchaterre, M.A., Bass, A.H., & Myers D.A. (1995). Structure, localization, and molecular phylogeny of a GnRH cDNA from a Paracanthopterygian fish, the plainfish midshipman (*Porichthys nonatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 99: 85-99.
- Habibi, H.R. & Pati, D. (1993a). Endocrine and paracrine control of ovarian function: Role of compounds with GnRH-like activity in goldfish. En: Cellular Communications in

Reproduction” (ed. por Fachinetti,F., Henderson, R., Pierantoni, R. & Polzonetti-Magni, A.M.) pg.59-70. Journal of Endocrinology Ltd., Bristol, UK.

Habibi, H.R. & Pati, D. (1993b). Extrapituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding sites in goldfish. *Fish Physiol. Biochem.* 11:43-49.

Habibi, H.R., Pati, D., Ouwens, M., & Goos, H.J.T. (1994). Presence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding sites and compounds with GnRH-like activity in the ovary of African catfish, *Clarias gariepinus*. *Biol Reprod.* 50:643-652.

Hayes, W.P., Wray, S. & Battey, J.F. (1994). The frog gonadotropin-releasing hormone-I (GnRH-I) gene has mammalian-like expression pattern and conserved domains in GnRH-associated peptide, but brain onset is delayed until metamorphosis. *Endocrinology.* 134:1835-1845.

He, M.L.; Cheng, K.W.; Yu, K.L.; Dong, K.W., Chow, B.K.C. & Chang, J.P. (1997). Cloning and characterization of a goldfish gonadotropin-releasing hormone receptor, Abstracts, Society for Neuroscience 27th Annual Meeting, New Orleans, L:A, p. 964.

Herrick, C.J. (1948). The brain of the Tiger salamander, University of Chicago Press, Chicago.

Hoffman, G.E. & Berghorn K. A. (1997). Gonadotropin-releasing hormone neurons: Their structure and function. In: *Seminars in Reproductive Endocrinology.* 15:5-17.

Hsueh, A.J.W. & Shaeffer, J.M. (1985). Gonadotropin-releasing hormone as a paracrine hormone and neurotransmitter in extra-pituitary sites. *J. Steroid Biochem.* 23:757-764.

Hunt, S.M.V.; Simpson, T.H. & Wright, R.S. (1982). Seasonal changes in the levels of 11-oxotestosterone and testosterone in the serum of male salmon, *Salmon salar* L., and their relationship to growth and maturation cycle. *J. Fish. Biol.* 20:105-119.

Idler, D.R. & Everard, B.A. (1987). Mammalian, salmon and chicken-like LHRH's from hypothalami of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) as evidence by chromatographic mobility and immunoreactivity. In: Idler, D.R., Crim, L.W., Walsh, J.M., (eds). *Proceedings of the Third International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, Newfoundland, Canada: Marine Science Research Laboratory, Memorial University of Newfoundland. Pg 30.

Ivankov, V.N. (1983). Causes of variation in fecundity and age of sexual maturation in monocyclic fishes with examples from salmon, genus *Onchorynchus*. *J. Ichthyol.* 23:84-93.

Jimenez-Liñan, M., Rubin, B. S. & King, J. C. (1997). Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain. *Endocrinology* 138:4123-4130.

Jobin, R.M., Neumann, C.M. & Chang, J.P. (1996). The roles of calcium and calmodulin in the mediation of acute and sustained GnRH-stimulated gonadotropin secretion from dispersed goldfish pituitary cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101:91-106.

Joss, J.M.P., King, J.A., & Millar, R.P. (1994). Identification of the molecular forms of an steroid hormone response to gonadotropin-releasing hormone in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Gen. Com. Endocrinol.* 96:392-400.

Kah, O.P., Brenton, J.G., Dulka, J., Nuñez-Rodriguez J., Peter, R.E., Corrigan, J.E., Rivier, J.E. & Vale W.W. (1986). A reinvestigation of the GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) systems in the goldfish brain using antibodies to salmon GnRH. *Cell Tiss. Res.* 244:327-337.

Kah, O.P., Chambolle, P., Dubourg, M.P. & Dubois, M.P. (1994). Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone in the brain of the *goldfish Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 53:107-115.

Kahn, I.A. & Thomas, P. (1993). Immunocytochemical localization of serotonin and gonadotropin-releasing hormone in the brain and pituitary gland of the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 91:167-180.

Kakisawa, S., Kaneko, T., & Hirano, T. (1997). Effects of hypothalamic factors on somatolactin secretion from the organ-cultured pituitary of rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105, 71-78.

Kalra, S. P. (1993). Mandatory neuropeptide-steroid signalling for the pre-ovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr. Rev.* 14:507-538.

Kasten, T.L., White, S.A., Norton, T.T., Bond, C.T., Adelman, J.P. & Fernald, R.D. (1996). Characterization of two new preproGnRH mRNAs in the tree shrew: First direct evidence for mesencephalic GnRH gene expression in a placental mammal. *Gen. Comp. Endocrinol.* 104:7-19.

Kawamura, K. & Kikuyama, S. (1998). Developmental origin of the olfactory system and GnRH neurons in the Anphibia. *Trens in Comparative Endocrinology and Neurobiology.* 839:201-204.

Kelsall, R.; Coe, I.R. & Sherwood, N.M. (1990). Phylogeny and ontogeny of gonadotropin releasing hormone: comparison of guinea pig, rat, and a protochordate. *General and Comparative Endocrinology* 78: 479-494.

Kim, H., Amano, M. & Suetake, H. (1997). GnRH neurons and gonadal maturation in masu salmon and goldfish. En "GnRH neurons: Gene to behaviour". (ed. Por Parhar I.S. & Sakuma, Y.), pp 313-325. Brain Shuppan, Japan.

King, J.A. & Millar, R.P. (1982a). Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone I. Structural determination on partially purified material. J. Biol. Chem. 257:10722-10728.

King, J.A. & Millar, R.P. (1982b). Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone II. Isolation and characterization. J.Biol.Chem. 257:10729-10728.

King, J.A. & Millar, R.P. (1985). Multiple molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in teleost fish brain. Peptides 6:689-694.

King, J.A.; and Millar, R.P. (1986). Identification of His⁵, Trp⁷, Tyr⁸-GnRH (chicken GnRH II) in amphibian brain. Peptides 7: 827-834.

King, J.A.; Hassan, M.F.; Mehl, A.E.I. & Millar, R.P. (1988). Gonadotropin-releasing hormone molecular forms in mammalian hypothalamus. Endocrinology 122: 2742-2752.

King, J.A., Mehl, A.E.I., Tyndale-Biscoe, C.H., Hinds, L.A. & Millar, R.P. (1989). A second form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), with chicken II-like properties, occurs together with mammalian GnRH in marsupial brains. Endocrinology 125:2244-2252.

King, J.A., Hinds, L.A., Mehl, A.E.I., Saunders, N.R., & Millar, R.P. (1990a). Chicken GnRH II occurs together with mammalian GnRH in South American species of marsupial (*Monodelphis domestica*). Peptides 11:521-525.

King, J.A., Dufour, S., Fontaine, Y.A. & Millar, R.P. (1990b). Chromatographic and immunological evidence for mammalian GnRH and cIIGnRH in eel (*Anguilla anguilla*) brain and pituitary. Peptides, 11:507-514.

King, J.A.; Steneveld, A.A.; Millar, R.P.; Faseno, S.; Romano, G.; Spagnuolo, A.; Zanetti, L.; Pierantoni, R. (1992). Gonadotropin-releasing hormone in elasmobranch (electric ray, *Torpedo marmorata*) brain and plasma: chromatographic and immunological evidence for chicken GnRH-II and novel molecular forms. Peptides 13:27-35.

King, J.A., Steneveld, A.A., Curlewis, J.D., Rissman, E.F., & Millar, R.P. (1994). Identification of Chicken GnRH II in brains of metatherian and early-evolved eutherian species of mammals. Regul. Peptides 54:467-477.

King, J.A., Millar, R.P., Vallarino, M., & Pienaroti, R. (1995). Localization and characterization of gonadotropin-releasing hormones in brain, gonads, and plasma of a dipnoi (lungfish, *Protopterus annectens*). Regul. Pept. 57:163-174.

King, J.A. & Millar, R. (1995). Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 15:5-23.

Klungland, H., Lorens, J.B., Anderson, O., Kisen, G.O., & Alestrom, P. (1992). The Atlantic salmon prepro-gonadotropin releasing hormone gene and mRNA. *Mol. Cell. Endocrinol.* 84:167-174.

Koide, Y., Itoh, H. & Kawauchi, H. (1993). Isolation and characterization of two distinct gonadotropins, GTH I and GTH II, from bonito (*Katsuwonus plenianis*) pituitary glands. *Int. J. Peptide Protein Res.* 41:52-65.

Kudo, H., Ueda H., Kawamura H., Aida K. & Yamauchi K. (1994). Ultrastructural demonstration of salmon-type gonadotropin-releasing hormone (sGnRH) in the olfactory system of masu salmon (*Onchorhynchus masou*).

Kuenzel, W.J. & Blahser S. (1991). The distribution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and fibers throughout the chick brain (*Gallus domesticus*). *Cell Tiss. Res.* 264:481-495.

Lamberts, W.S., Uitterlinden, P., Reubi, J.C. & Jong, F.H. (1989). Effects of gonadotropin-releasing hormone and its agonist on prolactin secretion from the normal and tumorous pituitary cells. *Neuroendocrinology*. 49:157-163.

Larhammar, D. & Risinger, C. (1994). molecular genetic aspects of tetraploidy in the common carp *Cyprinus carpio*. *Mol Phylogenet Evol* 3: 59-68.

Le Bail (1988). Growth-reproduction interaction in salmonids. En: *Reproduction in fish, Basic and applied aspects in endocrinology and genetics* (eds. Por Zohar, Y. & Breton, B.; INRA, Paris Les Colloques de l'INRA, nro 44. Pp 91-108

Le Gac F., Blaise O., Fostier A., Le Bail P.Y., Loir M., Mourot B. & Weil C. (1993). Growth hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiology and Biochemistry* 11:219-232

Lêprete, E. Anglade, P. Williot, F., Vandesande, G., Tramu G. & Kah, O. (1993). Comparative distribution of mammalian GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) and chicken GnRH-II in the brain of the immature Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *J. Comp. Neurol.* 337: 568-583.

Lescheid, D. W., Powell, J.F.F., Fisher, W.H., Park, M., Craig, A., Bukovskaya, O., Barannikova, I.A. & Sherwood, N.M. (1995). Mammalian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) identified by primary structure in Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedti*. *Regul. Peptides* 55:299-309.

Lescheid, D. W.; Terasawa, E.; Abler, L.A.; Urbanski, H.F.; Warby, C.M.; Millar, R.P. & Sherwood, N.M. (1997) A second form of gonadotropin releasing hormone (GnRH) with

characteristics of chicken GnRH-II is present in the primate brain. *Endocrinology* 138: 5618-5629.

Levavi-Sivan, B. & Yaron, Z. (1992). Involvement of cyclic adenosine monophosphate in the stimulation of gonadotropin secretion from the pituitary of the teleost fish, tilapia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 85:175-182.

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

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

Lin, X.W.; Otto, C.J. & Peter, R.E. (1998). Evolution of neuroendocrine peptide systems: Gonadotropin-releasing hormone and somatostatin. *Comp Biochem Physiol* 118C: 365-374.

Lovejoy, D.A., Sherwood, N.M., Fischer, W.H., Jackson, B.C., Rivier, J., & Lee, T. (1991a). Primary structure of gonadotropin-releasing hormone from the brain of the holocephalan (ratfish: *Hydrogalus colliei*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 82:152-161.

Lovejoy, D.A., Fischer, W.H, Parker, Mc Rory, J.E., Park, M., Lance, V., Swanson, P., Rivier, J.E., & Sherwood, N.M. (1991b). Primary structure of two forms of gonadotropin-releasing hormone from brains of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Regul. Pept.* 33:105-116.

Lovejoy, D.A., Fischer, W.H., Ngamvongchon S, Craig, A.G., Nahorniak, C.S., Peter, R.E., Rivier, J.E. & Sherwood, N.M. (1992a). Distinct sequence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)* 89:6373-6377.

Lovejoy, D.A.; Stell, W.K. & Sherwood, N.M. (1992b). Partial characterization of four forms of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in the brain and terminal nerve of spiny dogfish (Elasmobranchii; *Squalus acanthias*). *Regul Peptides* 37: 39-48.

Lovejoy, D.A., King, J.A., Sherwood, N.M. & Peter, R.E. (1993). Identification of gonadotropin-releasing hormone and associated binding substances in the blood serum of an holocephalan (*Hydrolagus colliei*). *Peptides* 14:1237-1243.

Magliulio-Cepriano, L.; Screibman, M.P. & Blum, V. (1994). Distribution of variant forms of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone and beta-gonadotropins I and II in the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, from birth to sexual maturity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94:135-150.

- Mahmoud, S.S., Moloney, N.M., Habibi, H.R. (1996). Cloning and sequencing of the goldfish growth hormone cDNA. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89:62-71.
- Maler, L., Sas, E., Johnston, S., Ellis, W. (1991). An atlas of the brain of the electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *Journal of Chemical Neuroanatomy.* 4:1-38.
- Mason, A.J., Hayflick, J.S., Zoeller, R.T., Young III, W.S., Phillips, H.S., Nickolis, K. & Seeburg, P.H. (1986). A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the *hpg* mouse. *Science* 234:1366-1371.
- Marchant, T.A. & Peter, R.E. (1986). Seasonal variation in body growth rates and circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Experimental Zoology* 237: 231-239.
- Marchant, T.A. & Peter, R.E. (1989). Hypothalamic peptides influencing growth hormone secretion in the goldfish, *Carassius auratus*. *Fish Physiol. Biochem.* 7:133-139.
- Marchant, T.A., Chang, J.P., Nahorniak, C.S., & Peter, R.E. (1989). Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish. *Endocrinology.* 124:2509-2518.
- Masucci, M., D'Aniello, B., Iela L., Ciarcia G. & Rastogi P.K. (1992). Immunohistochemical demonstration of the presence and localization of diverse molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in the lizard (*Podarcis s. sicula*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 86:81-89.
- Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R.M.G., 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.
- Melamed, P., Eliahu, N., Levavi-Sivan, B., Ofir, M., Farchi-Pisanty, O., Renteier-Delrube, F., Smal, J., Yaron, Z., & Naor, Z. (1995). Hypothalamic and thyroidal regulation of growth hormone in tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64: 396-400.
- Melamed, P. Gur, G., Elizur, A., Rosenfeld, H., Sivan, B., Rentier-Delrue, F. & Yaron, Z. (1996). Differential effects of gonadotropin-releasing hormone, dopamine and somatostatin and their second messengers on the mRNA levels of gonadotropin II β subunit and growth hormone in the teleost fish, tilapia. *Neuroendocrinology* 64:320-328.
- Millan, J.R., Faris, O.M. & Youngren, M.E. (1993). Immunohistochemical localization of chicken gonadotropin-releasing hormones I and II (cGnRH I and II) in turkey brain. *J. Comp. Neurol.* 33:63-82.

Millam, J.R., Ottinger, M.A., Craig-Veit, C.B., Fan, Y., Chaiseha, Y. & El Halawami, M.E. (1998). Multiple forms of GnRH are released from perfused medial basal hypothalamic/preoptic area (MBH/POA) explants in birds.

Millar, R.P., Wormald, P.J. & Milton R.C. (1986). Stimulation of gonadotropin release by non-GnRH peptide sequence of the GnRH precursor. *Science* 232:68-70.

Milton, R.C., Wormald, P.J., Brandt, W. & Millar, R.P. (1986). The delineation of a decapeptide gonadotropin-releasing sequence in the carboxyl-terminal extension of the human gonadotropin-releasing hormone precursor. *J. Biol. Chem.* 261:16990-16997.

Mikami, S.I., Yamada, S., Hasegawa Y. & Miyamoto K. (1988). Localization of avian LHRH immunoreactive neurons in the hypothalamus of the domestic fowl, *Gallus domesticus*, and the Japanese quail, *Coturnix coturnix*. *Cell and Tissue Res.* 251:51-58.

Miranda, L.A., Paz, D.A., Affanni, J.M. & Somoza, G.M. (1998a). Identification and neuroanatomical distribution of immunoreactivity from mammalian gonadotropin-releasing hormone (mGnRH) in the brain and neural hypophyseal lobe of the toad *Bufo arenarum*. *Cell Tissue Res.* 293: 419-425.

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

Miyamoto K., Hagesawa Y., Nomura M., Igarashi M., Kangawa K., Matsuo H. (1984). Identification of the second gonadotropin releasing hormone in the chicken hypothalamus: evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.)* 81:3874-3878.

Montaner, A.D.; Somoza, G.M.; King, J.A.; Bianchini, J.J.; Bolis, G.; Affanni, J.M. (1998). Chromatographic and immunological identification of GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) variants. Occurrence of mammalian and salmon-like GnRH in the forebrain of an eutherian mammal: *Hydrochaeris hydrochaeris* (Mammalian, Rodentia). *Regulatory Peptides.* 73:197-204.

Montaner, A.D.; Affanni, J.M.; King, J.A.; Bianchini, J.J.; Tonarelli, G. & Somoza, G.M. (1999). Differential distribution of Gonadotropin-releasing Hormone variants in the brain of *Hydrochaeris hydrochaeris*. *Cell Mol Neurobiol.* En prensa.

Montero, M., Vidal, B., King, J.A., Tramu, F., Vandesande, S., Dufour, S. & Kah, O. (1994). Immunocytochemical localization of mammalian GnRH (gonadotropin-releasing hormone) and chicken GnRH-II in the brain of the European silver eel (*Anguilla anguilla*). *J. Comp. Endocrinol.* 64:396-400.

Moons, L., Cambré, M., Ollevier, F. & Vandesande, F. (1989). Immunocytochemical demonstration of close relationships between neuropeptidergic nerve fibers and hormone-

producing cell types in the adenohypophysis of the Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Gen. Comp. Endocrinol. 73: 270-283.

Mukhopadhyay, B., Biswas, R. & Bhattacharya, S. (1995). Gonadotropin releasing hormone stimulation of cyclic 3',5'-AMP in the pituitary cells of a teleost (*Channa punctatus*, Bloch) requires extracellular calcium: Its relationship to gonadotropin release. Gen. Comp. Endocrinol. 97:353-365.

Münz, H., Stumpf, W.E. & Jennes L. (1981). LHRH systems in the brain of platyfish. Brain Research. 221:1-13.

Münz, H., Claas, B., Stumpf, W. E. (1982). Centrifugal innervation of the retina by luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-immunoreactive telencephalic neurons in teleostean fishes. Cell. Tissue Res. 222: 313-323.

Münz, H. & Claas (1987). The terminal nerve and its development in the teleost fishes. En: "The terminal nerve (*nervus terminalis*) structure, function and evolution (ed. Por Demski L.S. & Schwanzel-Fukuda M.), Ann. N.Y. Acad. Sci. 519:50-59.

Murakami, S., Seki, K., Wakabayashi K. & Arai Y. (1991). The ontogeny of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) producing neurons in the chick embryo: Possible evidence for migrating LHRH neuron from the olfactory epithelium expressing a highly polysialylated neural cell adhesion molecule. Neurosci. Res. 12:421-431.

Murakami, S., Kikuyama, S., & Arai Y. (1992). The origin of the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in newts (*Cynops pyrrhogaster*): The effect of olfactory placode ablation. Cell. Tiss. Res. 269:215,230.

Muske, L.E., & Moore, F.L. (1987). Luteinizing hormone-releasing hormone-immunoreactive neurons in the amphibian brain are distributed along the course of the nervus terminalis. En: The terminal nerve (Nervus Terminalis) structure, function and evolution (ed. Por Demski and Schwanzel-Fukuda). Ann. N.Y. Acad. Sci. 519:433-446.

Muske, L. E. (1993). Evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neural systems. Brain Behav. and Evol. 42: 215-230.

Muske, L.E. & Moore, F.L. (1994). Antibodies against different forms of GnRH define different cells and axonal pathways in a urodele amphibian, *Taricha granulosa*. J. Comp. Neurol. 345:139-147.

Muske, L.E., King, J.A., Moore, F.L. & Millar, R.P. (1994). Gonadotropin-releasing hormones in microdissected regions of an amphibian: Concentration and anatomical distribution of immunoreactive mammalian GnRH and chicken GnRH-II. Reg. Peptides. 54:373-384.

Muske, L.E. (1997). Ontogeny, Phylogeny and Neuroanatomical organization of multiple molecular forms of GnRH. En "GnRH neurons: Gene to behaviour". (ed. Por Parhar I.S. & Sakuma, Y.), pp 147-168. Brain Shuppan, Japan.

Nelson, J.S. (1994). Fishes of the world. 3rd Edition. Wiley Interscience Publications. John Wiley and sons. New York.

Ngamvongchon, S., Lovejoy, D., Fischer, W., Craig, A., Nahorniak, C., Peter, R., Rivier, J. & Sherwood, N. M.(1992a). Primary structure of the two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. Brain. Mol. and Cell Neurosciences 3:17-22.

Ngamvongchon, S., Sherwood, N. M., Warby, C.M., & Rivier, J. &(1992b). Gonadotropin-releasing hormone from Thai catfish: Chromatographic and physiological studies. Gen. Comp. Endocrinol. 87:266-274.

Niall, H.D., Hogan, M.L., Sauer, R., Roseblum, I.Y. & Greenwood, F.C. (1971). Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68: 866-871.

Nickolis, K., Mason, A.J., Szonyi, E., Ramanchandram, J. & Seeburg, P.H. (1985). A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human gonadotropin-releasing hormone. Nature 316:511-517.

Nishioka, R.S., Kelley, K.M. & Bern, H.A. (1988). Control of prolactin and growth hormone secretion in teleost fishes. Zool. Sci. 5:267-280.

Norgren, R.J. Jr, & Lehman M.N. (1991). Neurons that migrate from the olfactory epithelium in the chick express luteinizing hormone-releasing hormone. Endocrinol.128:1676-1678.

Norgren, R.B., Lippert J., Lehman M.N. (1992). Luteinizing hormone-releasing hormone in the pigeon terminal nerve and olfactory bulb. Neurosci. Lett. 135:201-204.

Norgren, R.B., Gao, C., Yongjie J., & Fritzch. (1995). Tangential migration of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neurons in the medial telencephalon in association with transient axons extending from the olfactory nerve. Neurosci. Lett. 202:1-4.

Northcutt, R.G., & Kicliter, E. (1980). Organization of the amphibian telencephalon. En: Comparative Neurology of the telencephalon (ed. By S.O.E. Ebbenson), Plenum, New York, pp. 203-255.

Northcutt, R.G.; & Muske, L.E. (1994). Multiple embryonic origins of gonadotropins releasing hormone (GnRH) immunoreactive hormones. Dev. Brain Res 78: 279-290.

- Nozaki, M.; Gorbman, A. & Sower, S.A. (1994). Diffusion between the neurohypophysis and the adenohypophysis of lampreys, *Petromizon marinus*. Gen.Comp. Endocrinol. 96: 385-391.
- Núñez-Rodríguez, J.; Kah, O.; Breton, B.; & le Menn, F. (1985). Immunocytochemical localization of GnRH (gonadotropin-releasing hormone) systems in the brain of marine teleost fish, the sole. *Experientia* 41:1574-1576.
- Olivereau, M. & Rand-Weaver, M.(1994). Immunoreactive somatolactin cells in the pituitary of young, migrating, spawning and spent chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 13:141-151.
- Ohno, S. (1970). Evolution by gene duplication. Berlin: Springer.
- Ohta, T. (1991). Multigene families and the evolution of complexity. *J. Mol. Evol.* 33: 34-41.
- O'Neill, D.F.; Powell, J.F.F.; Standen, E.M.; Youson, J.H.; Warby, C.M. & Sherwood, N.M. (1998). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ancient teleosts, the bonytongue fishes: putative origin of sGnRH. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 415-425.
- Oka, Y. & Ichikawa et al. (1990). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactive system in the brain of the dwarf gourami (*Colisa lalia*) as revealed by light microscopic immunocytochemistry using a monoclonal antibody to common amino-acid sequence of GnRH. *J. Comp. Neurol.* 300: 511-522.
- Oka, Y. (1997). GnRH neuronal system of fish brain as a model system for the study of peptidergic neuromodulation. En: "GnRH neurons: Gene to behaviour". (ed. Por Parhar I.S. & Sakuma, Y.), pp 245-276. Brain Shuppan, Japan.
- Okada, T., Kawasoe, I., Kimura, S., Sasamoto, Y., Aida, K. & Kawauchi, H. (1994). Purification and characterization of gonadotropin I and II from pituitary glands of tuna, (*Thunnus obesus*). *Int. J. Pept. Prot. Res.* 43:69-80.
- Okusawa, K., Amano, M., Kobayashi, M., Aida, K., Hanyu, I., Hasegawa, Y. & Miyamoto, K. (1990). Differences in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in discrete brain areas of male and female rainbow trout according to age and stage of maturity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80:116-126.
- Okusawa, K., Araki, K., Tanaka, H., Kagawa, M., & Hirose, K. (1994). Molecular cloning of a cDNA encoding the prepro-salmon gonadotropin-releasing hormone ([Trp⁷, Leu⁸]-GnRH of the red seabream. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96:234-242.
- Okusawa, K.; Granneman, J.; Bogerd, J.; Goos, H.J.; Zohar, Y.; & Kagawa, H. (1996). Distinct expression of GnRH genes in the red seabream brain. 3rd International Symposium of Fish Endocrinology, Hakodate, Japan. Abstract 0-40

- Parhar, I.S. & Munehico, I. (1994). Gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons project to growth hormone and somatolactin cells in the Steelhead trout. *Histochemistry* 102:195-203.
- Parhar, I.S.; Soga, T.; Ishikawa, Y.; Hagahama, Y. & Sakuma, Y. (1998a). Neurons synthesizing gonadotropin-releasing hormone mRNA subtypes have multiple developmental origins in the medaka. *J Comp Neurol* 401: 217-226.
- Parhar, I.S.; Soga, T. & Sakuma, S. (1998b). Quantitative in situ hybridization of three gonadotropin-releasing hormone encoding mRNAs in castrated and progesterone treated male tilapia. *Gen Comp Endocrinol* 112: 406-414.
- Park, M. K. & Wakabayashi, K. (1986). Preparation of a monoclonal antibody to common amino acid sequence of LHRH and its application. *Endocrinol. Japan.* 33:257-272.
- Pati, D. & Habibi, H.R. (1992). Characterization of gonadotropin-releasing hormone receptors in the ovary of common carp (*Cyprinus carpio*). *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70:268-272.
- Pati, D. & Habibi, H.R. (1993a). Characterization of gonadotropin-releasing hormone receptors in goldfish ovary: Variation during follicular development. *Am. J. Physiol.* 264: 227-234.
- Pati, D. & Habibi, H.R. (1993b). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding characteristics in the testis of goldfish (*Carassius auratus*). *J. Exp. Zool* 267:155-163.
- Pati, D. & Habibi, H.R (1998). Presence of salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and compounds with GnRH-like activity in the ovary of goldfish. *Endocrinology* 139: 2015-2024.
- Peter, R.E. & Gill, V.E. (1975a). A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei of the goldfish, *Carassius auratus*. *The Journal of Comparative Neurology.* 159:69-100.
- Peter, R.E. & Gill, V.E. (1975b). A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *The Journal of Comparative Neurology.* 159:103-127.
- Peter, R.E., Yu, K.L., Marchant, T.A. & Roseblum, P. (1990). Direct neural regulation of the teleost adenohypophysis. *J. Exp. Zool.* 4:84-89.
- Peter, R.E. & Marchant, T.A. (1995). The endocrinology of growth in carp and related species. *Aquaculture* 129:299-321.
- Peter, R.E. & Yu, K.L. (1997). Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries.* 7:173-197.

Pierantoni, R. & Fasano, S. (1991). Functional morphology and regulation of the hypothalamus-hypophysis-gonadal axis: a comparative overview. En: Form and function in zoology. Editado por Lanzavecchia, G. & Valvassori, R. Mucchi, Modena. pp. 225-243.

Planas, J.V. & Swanson, P. (1995). Maturation-associated changes in the response of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins (GTH I and GTH II) in vitro. Biol. Reprod. 52:697-704.

Powell, R.C.; King, J.A. & Millar, R.P. (1984). [Trp, Leu] LH-RH in reptilian brain. Peptides. 6:223-227.

Powell, R.C.; King, J.A.; & Millar, R.P. (1985). [Trp⁷, Leu⁸]LH-RH in reptilian brain. Peptides 6: 223-228.

Powell, R.C., Millar, R.P. & King, J.A. (1986a). Diverse molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in an elasmobranch and a teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol. 63:77-87.

Powell, R.C.; Ciarcia, G.; Lance, V.; Millar, R.P. & King, J.A. (1986b). Identification of diverse molecular forms of GnRH in reptile brain. Peptides 7: 1101-1108.

Powell, R.C., Jach, H., Millar, R.P. & King, J.A. (1987) Identification of Gln⁸-GnRH and His⁵, Trp⁷, Tyr⁸-GnRH in the hypothalamus and extrahypothalamic brain of the ostrich (*Struthio camelus*). Peptides 8:185-190.

Powell J. F.F., Zohar Y., Elizur A., Park M., Fischer W.H., Craig A., Rivier J.E., Lovejoy D. & Sherwood N. (1994). Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterised from brains of one species. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 91:12081-12085.

Powell J.F.F., Fischer, W.H., Park, M., Craig, A.G., Rivier J.E., White, S.A., Francis, R.C., Fernald, R.D., Licht, P., Warby, C., & Sherwood N.M. (1995). Primary structure of solitary form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in cichlid pituitary, three forms of GnRH in brain of cichlid and pumpkinseed fish. Regul. Peptides 57:43-53.

Powell J.F.F., Reska-Skinner, S., Prakash, M.O., Fischer, W.H., Park, M., Rivier, J.E., Craig, A.G., Mackie, G.O. & Sherwood, N.M. (1996a). Two new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications. Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.) 93:10461-10464.

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

Powell, J.F.F., Standen, E.M., Carosfeld J., Borella, M., Gazola, R., Fischer, W.H., Park, M., Craig, A.G., Warby, C.M., Rivier, J.E., Val-Sella, M.V. & Sherwood N.M. (1997). Primary structure of three forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the pacu brain. *Reg. Pept.* 68:189-195.

Rand-Weaver, M., Noso, T., Muramoto, K. & Kawauchi, H. (1991). Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. *Biochemistry* 30:1509-1515.

Rand-Weaver, M., Swanson, P., Kawauchi, H., & Dickhoff, W.W. (1992). Somatolactin, a novel pituitary protein: purification and plasma levels during reproductive maturation of coho salmon. *J. Endocrinol.* 133:393-403.

Rand-Weaver, M., Kawauchi, H. & Ono, M. (1993). Evolution of the structure of the growth hormone and prolactin family. En: "The Endocrinology of growth, development, and metabolism in vertebrates" (ed. por Schreibman, M.P., Scanes, C.G. & Pang, P.K.T.) pg 13-42. Academic Press, San Diego.

Ravaglia, M.A.; Lo Nostro, F.L.; Maggesse, M.C.; Guerrero, G.A.; Somoza, G.M. (1997). Characterization of molecular variants of GnRH, induction of spermiation and sex reversal using salmon GnRH-A and domperidone in the protogynous diandric fish, *Symbranchus marmoratus* Bloch, (Teleostei, Synbranchidae)

Ribeiro, L. & Ahne, W. (1982). Fish cell culture: Initiation of a line of pituitary cells from carp (*Cyprinus carpio*) to study the release of gonadotropin *in vitro*. *In vitro* 18:419-420.

Ringuelet, R.(1943).Piscicultura del pejerrey o aterinicultura. Colección Agro, Editorial Suelo Argentino. pp 162.

Ringuelet, R. (1967). Peces argentinos de agua dulce. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires. Pg 467-473.

Rissman, E.F.; Alones, V.E.; Craig-Veit, C.B. & Millam, J.R. (1995). Distribution of chicken-II gonadotropin-releasing hormone in mammalian brain. *J. Comp. Neurol.* 357: 524-531.

Rodriguez Gil, D., Stolowicz F., Somoza G.M, King J.A, Aldana-Marcos, H. & Affanni J. En elaboración. Gonadotropin-Releasing Hormone in the brain of the South american armadillo *ChaetophRACTUS villosus* (Edentata). Characterization and immunohistochemical localization.

Ronnekleiv O.K., Naylor B.R., Bond C.T. & Adelman J.P. (1989). Combined immunohistochemistry for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and pro-GnRH, and *in situ* hybridization for GnRH messenger ribonucleic acid in rat brain. *Molec. Endocrinol.* 3:363-371.

- Ronnekleiv, O. & Resko, J.A. (1990). Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone containing neurons in early fetal development of rhesus monkeys. *Endocrinology* 126: 498-511.
- Roth, G., Nishikawa, K.C., Naujoks-Manteuffel, C. Schmidt, A., & Wake, D.B. (1993). Paedomorphosis and simplification in the nervous system of salamanders. *Brain Behav. Evol.* 42:137-170.
- Saavedra, J.M. & Piacentino, G. (1991). *Medio Ambiente* 11:61-68.
- Saavedra, J.M. (1992) Brain and pituitary angiotensin. *Endocrine Reviews.* 13:329-380.
- Sakamoto, T., Shepherd, B.S., Madsen, S.S., Nishioka, R.S., Siharath, K., Richman III, N.H., Bern, H.A. & Grau, E.G. (1997). Osmoregulatory actions of growth hormone and prolactin in an advanced teleost. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106:95-101.
- Sato, S. (1980). Post-natal development, sexual difference and sexual cycle variation of prolactin cells in rats: special references to the topographic affinity of gonadotrophs. *Endocrinologia Japónica.* 27:573-583.
- Schulz, R.W., Bogerd, J., Bosma, P.T., Peute, J., Rebers, F.E.M., Zandbergen, M.A., & Goos, H.J.T.H. (1995). Physiological, morphological and molecular species of gonadotropins in a fish with special reference to the African catfish, *Clarias gariepinus*. En: *Reproductive Physiology of Fish* (F.W. Goetz y P. Thomas). *Proc. Fifth Int. Symp. On Reprod. Austin, Texas. Fish Sym.* 95:2-6.
- Schwanzel-Fukuda, M., & Silverman, A.J. (1980). The nervus terminalis of the guinea pig: A new luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neuronal system. *J. Comp. Neurol.* 191:213-225.
- Schwanzel-Fukuda, M. & Pfaff, D.W. (1991). Migration of LHRH-immunoreactive neurons from the olfactory placode reorganizes olfacto-hormonal relationships. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39:565-572.
- Schwanzel-Fukuda, M.; Crossin, K.L.; Pfaff, D.W.; Bouloux, P.M.G.; Hardelin, J.P. & Petit, C. (1996). Migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in early human embryos. *J Comp Neurol* 366: 547-557.
- Schwanzel-Fukuda, M. (1997). The origin and migration of LHRH neurons in mammals: a comparison between species including humans. En "GnRH neurons: Gene to behaviour". (ed. Por Parhar I.S. & Sakuma, Y.), pp 221-242. Brain Shuppan, Japan.
- Seeburg, P.H. & Adelman, J.P. (1984). Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone-releasing hormone. *Nature* 311:666-668.

Sherwood N.M, Harvey B., Brownstein M., Spiess J., Rivier, J., & Vale, W. (1983). Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. Proc. Natl. Acad. Sci.(U.S.A.) 80:2794-2798.

Sherwood, N.M. ; Harvey, B.; Brownstein, M. & Eiden, L. (1984). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in striped mullet (*Mugil cephalus*), milkfish (*Chanos chanos*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*): comparison with salmon GnRH. Gen. Comp. Endocrinol. 55:174-181.

Sherwood, N.M., Sower, S.A., Marshack, D.R., Fraser B. & Brownstein, M. (1986a). Primary structure of gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. J. Biol. Chem 261:4812-4819.

Sherwood, N.M., Zoeller,, R.T. & Moore, F.L. (1986b). Multiple forms of gonadotropin-releasing hormone in amphibian brains. Gen. Comp. Endocrinol. 61:313-322.

Sherwood, N.M. (1987). Brain peptides in the control of fish reproduction. En: Proceedings of the Third International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. (ed. Por Idler, D.R., Crim, L. W., & Walsh, J.M.), pp 5-12. Marine Science Research Laboratory, Memorial University of New Founland, New Flounland, Canadá.

Sherwood, N.M. & Whittier, J.M. (1988). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from brains of reptiles: turtles (*Pseudemys scripta*) and snakes (*Thamnophis sirtalis parietalis*). Gen. Comp. Endocrinol. 69:319-327.

Sherwood, N.M.; De Leeuw, R. & Goos, H. (1989). A new member of the gonadotropin-releasing hormone family in teleost: catfish gonadotropin-releasing hormone. Gen. Comp. Endocrinol. 75:427-436.

Sherwood, N.M., Doroshov, S. & Lance, V. (1991). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in bony fish that are phylogenetically ancient: reedfish (*Calanoichthys calabaricus*), sturgeon (*Acipinser transmontatus*), and Alligator gar (*Lepisosteus spatula*). Gen. Comp. Endocrinol. 84:44-57.

Sherwood, N.M., Lovejoy, D.A. & Coe, I.R. (1993a). Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. Endocr. Rev. 14:241-254.

Sherwood, N.M., Grier, H. J., Warby, C., Peute, J. & Taylor, R.G. (1993b). Gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, in snook *Centropomus undecimalis*, in comparison with forms in black sea bass *Centropistis striata*. Reg. Peptides. 46:523-534.

Sherwood, N.M. & Lovejoy, D.A. (1993). Gonadotropin-releasing hormone in cartilaginous fish: structure, location and transport. Enviromental Biology of Fish 38:197-208.

Sherwood, N.M., Parker, D.B., Mc. Rory, J.E., & Lescheid, D.W. (1994). Molecular evolution of GHRH and GnRH. En: Molecular Endocrinology of Fish, Fish Physiology, vol XIII (ed. Por Farrell, A.P. & Randall, D.J.) New York, Academic Press, pp 3-66.

Sherwood, N.M., von Schalburg, K. & Lescheid, D.W. (1997). Origin and evolution of GnRH in vertebrates and invertebrates. En "GnRH neurons: Gene to behaviour". (ed. Por Parhar I.S. & Sakuma, Y.), pp 3-26. Brain Shuppan, Japan.

Siegmund, I.; Troncoso, S.; Caorsi, C. & González, C.B. (1987). Identification and distribution of the cell types in the pituitary gland of *Austromenidia laticlavia* (Teleostei, Atherinidae). Gen Comp Endocrinol 67: 348-355.

Silverman, A.J., Livne, I. & Witkin J.W. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry and in situ hybridization. En "The Physiology of Reproduction", 2da edición (ed. Por Knobil E. & Neill J.D.), pp:1683-1709. Raven, New York.

Sloan, H.E. & Demski L.S. (1987). Studies on the terminal nerve and its central connections in goldfish. En: "The terminal nerve (*nervus terminalis*) structure, function and evolution (ed. Por Demski L.S. & Schwanzel-Fukuda M.), Ann. N.Y. Acad. Sci. 519:421-432

Smith, M. & Moore F.L. (1996). The neuroanatomical distribution of gonadotropin-releasing hormone in the red-sided garter snake. Brain Behav. Evol. 49:137-148.

Somoza, G.M.; Stefano, A.V.; D'Eramo, J.L; Canosa, L.F. & Fridman, O. (1994). Immunoreactive GnRH suggesting a third variant form of GnRH in addition to cII GnRH and sGnRH in the brain and pituitary gland of *Prochilodus lineatus* (Characiformes) Gen. Comp. Endocrinol. 94:44-52.

Somoza, G.M ; Paz, D.A. ; Stefano, A.V & Affanni, J.M. (1996). Identification of immunoreactive mammalian gonadotropin-releasing hormone in the brain of metamorphic larvae of *Bufo arenarum* Hensel (Amphibia anura). International Journal of Developmental Neuroscience 14: 663-672.

Sower, S.A., Chiang Y., Lovas, S. & Conlon J. (1993). Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. Endocrinology 132:1125-1131.

Sower, S.A.; Nozaki, M.; Knox, C.J. & Gorbman, A. (1995). The occurrence and distribution of GnRH in the brain of Atlantic regfish, an agnatha, determined by chromatography and immunochemistry. Gen. Comp. Endocrinol. 97:300-307.

Standish, L.J., Adams, L.A., Vician L., Clifton, D.K. & Steiner, R.A. Neuroanatomical localization of cells containing gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic

acid in the primate brain by *in situ* hybridization histochemistry. *Molec. Endocrinol.* 1:371-376.

Stell, W.K., Walker, S.E., Chohan, K.S. & Ball, A.K. (1984). The goldfish nervus terminalis: A luteinizing hormone-releasing hormone and molluscan cardioexcitatory peptide immunoreactive olfactoretinal pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:940-944.

Stojilkovic, S.S. & Catt, K. (1995). Expression and signal transduction pathways of gonadotropin-releasing hormone receptors. *Recent progress in hormone research.* 50:161-205.

Strüssmann, C.A.(1989). Basic studies on seed production of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Doctoral thesis, Tokyo University of Fisheries, Tokyo, 351p.

Subhedar, N. & Krishna, N.S.R. (1988). Immunocytochemical localization of LH-RH in the brain and pituitary of the catfish, *Clarias batrachus* (Linn.) *Gen. Comp. Endocrinol.* 72:431-442.

Susuki, M., Hyodo, S., Kobayashi, M., Aida, K. & Urano, A. (1992). Characterization and localization of mRNA encoding the salmon-type gonadotropin-releasing hormone precursor of the masu salmon. *J.Mol.Endocrinol.* 9:73-82.

Swanson, P. (1991). Salmon gonadotropins: Reconciling old anew ideas. En: *Reproductive Physiology of Fish* (eds., por Scott, A.P. & Sumper, J.P.) Univ. of East Anglia, Norwich, England. pg 2-7.

Swanson, P. & Dittman, A. (1997). Pituitary gonadotropins and their receptors in fish. En: *International Congress of Comparative Endocrinology.* Yokohama, Japan. Pg 841-846.

Takana, H., Kagawa, K., Okusawa, K. & Hirose, K. (1993). Purification of gonadotropins (PmGTH I and II) from the red seabream (*Pagrus major*) and development of a homologous radioimmunoassay for PmGTH II. *Fish Physiol. Biochem.* 11:409-418.

Thomas, G.B., Cummis, J.T., Doughton, B.W., Griffin, N., Millar, R.P., Milton, R.C., & Clarke, I.J. (1988). Gonadotropin-releasing hormone associated peptide (GAP) and putative processed GAP peptides do not release luteinizing hormone or follicle stimulating hormone or inhibit prolactin secretion in the sheep. *Neuroendocrinology* 48:342-350.

Trudeau, V.L.; Peter, R.E. & Sloley, B.D. (1991). Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish. *Biology of Reproduction* 44: 951-960.

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

Trudeau, V.L. (1997). Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev Reprod* 2: 55-68.

Tsai, P.S. & Licht, P (1993). Differential distribution of chicken-I and chicken-II GnRH in the turtle brain. *Peptides* 14:221-226.

Uchiyama, H. (1990). Immunohistochemical subpopulation of retinopetal neurons in the nucleus olfactorretinalis in a teleost, the whitespotted greenling (*Hexagrammos stelleri*) J. *Comp. Neurol.* 293:54-62.

Van Asselt, L.A.C. (1989). Cell biological aspects of the control of gonadotropin release in the African catfish, *Clarias gariepinus*. Tesis Doctoral. Universidad de Utrech, pg 1-115.

Van Goor, F. Goldberg, J.I. & Chang, J.P. (1994). Ion channels in identified goldfish gonadotropin cells (abstract 167). *Programs and Abstracts 76th Annu Meet Endocr Soc, Anaheim.* Pg 242.

Vissio, P.G.; Paz, D.A. & Maggese, C. (1996). The adenohipophysis of the swamp eel, *Sybranchus marmoratus*: an immunocytochemical analysis. *Biocell* 20: 155-161.

Vissio, P.G., Somoza, G.M., Maggese, M.C., Paz, D.A., & Strüssmann, C. (1997a). Structure and type distribution in the pituitary gland of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Fisheries Sciences.* 63: 64-68.

Vissio, P.G.; Stefano, A.V.; Somoza, G.M.; Maggese, M.C. & Paz, D.A (1997b). Close association among GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) fibers and GtH, GH and SL expressing cells in pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atheriniformes). II Taller "La bioquímica en la Biotecnología Marina". La Habana, Cuba. Diciembre 10-13.

Vissio, P.G.; Paz, D.A. & Maggese, M.C. (1998). Somatolactina y su relación con el ciclo gonadal en el pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Taller integral sobre el recurso pejerrey en la Provincia de Buenos Aires. Chascomús. Provincia de Buenos Aires, Argentina. Diciembre 14-15.

Watson, R.E.; Wlegand, S.J.; Clough, R.W.; & Hoffman, G.E. (1986). Use of cryoprotectant to maintain long-term peptide immunoreactivity and tissue morphology. *Peptides.* 7:155-159.

Weber, G.M., Powell, J.F.F., Park, M., Fisher, W.H., Craig, A.G., Rivier, J.E., Nanakon, U., Parhar, I.S., Ngamvongchon, S., Grau, E.G. & Sherwood, N.M. (1997). Evidence that gonadotropin releasing hormone (GnRH) functions as a prolactin-releasing factor in a

teleost fish (*Oreochromis mossambicus*) and primary structures for three native GnRH molecules. *J. Endocrinol.* 155(1), 121-132.

Westel, W.C., Mellon, P.L., Weiner, R.I., & Negro-Vilar, A. (1991). Metabolism of pro-luteinizing hormone-releasing hormone in immortalized hypothalamic neurons. *Endocrinology* 129:1584-1594.

White, S., Bond, C.T., Francis, R.C., Kasten, T.L., Fernald, R.D. & Adelman, J.P. (1994). A second gene for gonadotropin-releasing hormone: cDNA and expression pattern in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*. 91:1423-1427.

White, S., Kasten, T.L., Bond, C.T., Adelman, J.P. & Fernald, R.D. (1995). Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel role for an ancient peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92:8363-8367.

White, R.B. & Fernald, R.D. (1998a). Ontogeny of Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression reveals a distinct origin for GnRH-containing neurons in the midbrain. *Gen Comp Endocrinol.* 112: 322-329.

White, R.B., Eisen, J.A., Kasten, T.L., Fernald, R. (1998b). Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:305-309.

Wray, S., Grant, P. Gainer, H. (1989). Evidence that cells expressing luteinizing hormone mRNA in the mouse are derived from the progenitor cells in the olfactory placode. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:8132-8136.

Wu, P.; Ackland, J.F.; Ling, W. & Jackson, I.M. (1986). Purification and characterization of luteinizing hormone-releasing hormone from codfish brain. *Regul. Peptides* 15:311-321.

Yamamoto, N., Oka, Y., Amano, M., Aida, K., Hasegawa Y. & Kawashima S. (1995). Multiple gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactive systems in the brain of the dwarf gourami, *Colisa lalia*: Immunohistochemistry and radioimmunoassay. *J. Comp. Neurol.* 355:354-368.

Yamamoto, N., Parhar, I.S., Sakuma, Y., Ito, H. (1998a). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) innervation of the pituitary in a cichlid fish, *Oreochromis niloticus*: A brain lesion study. *Acta Anat. Nippon.* 73:55-57.

Yamamoto, N., Oka, Y.; Yoshimoto, M.; Sawaii, N., Albert, J.A.; Ito, H. (1998b). Gonadotropin-releasing hormone in the gourami midbrain: a double labeling study by immunocytochemistry and tracer injection. *Neuroscience Letters* 240:50-52.

Yan, H.Y. & Thomas, P. (1991). Histochemical and immunocytochemical identification of the pituitary cells types in three sciaenid fishes: Atlantic croacker (*Micropogonias*

undulatus), spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) and red drum (*Sciaenops ocellatus*). Gen. Comp. Endocrinol. 84:389-400.

Yan, L., Swanson, P. & Dikhoff, W.W. (1992). A two receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). Biol. Reprod. 47:418-427.

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

Yu, K.L., Nahorniak, C.S., Peter, R.E., Corrigan, A., Rivier, J.E., & Vale, W.W. (1987). Brain distribution of radioimmunoassayable gonadotropin-releasing hormone in female goldfish: seasonal variation and periovulatory changes Gen. Comp. Endocrinol. 67: 234-246.

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

Zandbergen, T., Kah, O., Bogerd, J. & Peter, R.E. (1995). Expression and distribution of two gonadotropin-releasing hormones in the catfish brain. Neuroendocrinology, 62:571-578.