

Tesis de Posgrado

Identificación y distribución de la hormona hipofisaria Somatolactina en el pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atherinidae) : Su relación con el ciclo gonadal"

Vissio, Paula Gabriela

2000

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:

Vissio, Paula Gabriela. (2000). Identificación y distribución de la hormona hipofisaria Somatolactina en el pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atherinidae) : Su relación con el ciclo gonadal". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3283_Vissio.pdf

Cita tipo Chicago:

Vissio, Paula Gabriela. "Identificación y distribución de la hormona hipofisaria Somatolactina en el pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atherinidae) : Su relación con el ciclo gonadal". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3283_Vissio.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



TESIS
No.3283
Cs.Biologicas
VISSIO
Paula Gabriela

Biblioteca FCEyN • UBA



Laboratorio de Embriología Animal
Departamento de Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires

**“ Identificación y distribución de la hormona
hipofisaria Somatolactina en el pejerrey,
Odontesthes bonariensis (Teleostei,
Atherinidae). Su relación con el ciclo gonadal”**

Autor: Paula Gabriela Vissio

Directora: María Cristina Maggese

3283

**Trabajo de Tesis presentado para optar por el título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires**

2000

Hay gente que con solo decir una palabra, enciende la ilusión y los rosales

Que con solo sonreír entre los ojos, nos invita a viajar por otras zonas, nos hace recorrer toda la magia

Hay gente que con solo dar una mano, rompe la soledad, pone la mesa, sirve el puchero, coloca las guirnaldas

Que con solo empuñar una guitarra, hace una sinfonía de entrecasa

Hay gente que con solo abrir la boca, llega hasta los límites del alma, alimenta una flor, inventa sueños, hace cantar el vino en las tinajas

Y se queda después como si nada

Y uno se va de novio con la vida, desterrando una muerte solitaria, Pues sabe que a la vuelta de la esquina, hay gente que es así, tan necesaria.

H. Lima Quintana

Esta Tesis se la dedico a mis Padres, por darme mucho mas que la vida (de alguna manera hoy están conmigo)

Y a Fabio, Fermín y Emiliano que me hacen sentir de novia con la vida.

Agradecimientos:

Son muchas a las personas que debe agradecer. A cada uno le debo un poquito de esta Tesis ya que cada uno me ayudo de diferente manera. Gracias!!!:

A Cristina, mi Directora de Tesis, porque siempre confió en mí y en mi trabajo. Porque siempre me demostró un gran respeto y me permitió trabajar en libertad. Porque jamás se opuso a una idea o a un proyecto y sobre todo porque siempre sentí que antes de ser una becaria era una persona. Muchas gracias!

Al Dr. Carlos Strüssman, por las muestras de hipófisis de pejerrey. Le agradezco especialmente el apoyo que siempre me brindó y la confianza en mi trabajo.

A los investigadores que me enviaron los diferentes antisueros: Dr. Astola, Dr. Kawauchi, Dr. P. Thomas, Dr. R. Peter y Dra. M. Rand-Weaver.

Al Lic. G. Berassain y la Lic. Marcela Berassain (Secretaria de Pesca y Recursos Naturales, Ministerio de Asuntos Agrarios, Provincia de Buenos Aires) por los peces que nos facilitaran gentilmente.

A La Dra. D. Becú-Villalobos por cedernos la busnelina utilizada en esta Tesis.

Al Dr. Jorge Florin-Cristensen por el uso del flujo laminar y las instalaciones del laboratorio 55.

Al Dr. Boltovskoy y la gente de su laboratorio por permitimos utilizar el microscopio invertido.

A la Universidad de Buenos Aires, por darme la beca que me permitió realizar mi Tesis Doctoral. Le quiero agradecer que todavía y a pesar de todo siga permitiendo que todos tengamos el mismo derecho a estudiar.

Al departamento de Ciencias Biológicas en donde puede realizar este trabajo, y en donde encontré tanta gente que siempre me brindó su apoyo.

A los Docentes que me dieron lo mejor de sí.

A Dante, porque trabajar juntos fue una de las cosas mas lindas que me pasó. Gracias por estar siempre a mi lado ayudándome, muchas veces dejando tus propias cosas de lado. Vos sabes cuanto te quiero, y no es chiste cuando te digo que sos como un hermano.

A Mario. Sin tu ayuda creo que todavía estaría escribiendo el título de la Tesis. Gracias por todas las campañas que compartimos en el Ford de Clemente y por las que fuiste a buscar muestras para mí. Gracias por las horas frente a la computadora enseñándome a usar el Corel. Pero sobre todo gracias por ser tan pero tan buen amigo.

A Fabi, porque en este momento estaría tapada por una montaña de papeles, tratando de buscar alguno importante. Creo que en estos años me acostumbre muy mal a tener al lado alguien tan prolijo. Gracias por estar siempre dispuesta a darme una mano y gracias por tantos momentos hermosos que vivimos y seguiremos viviendo.

A Andrea, mi hermanita macana. Ojalá siguiéramos trabajando juntas!!!. Nunca me voy a olvidar de los experimentos eternos, de los que salieron bien y los que salieron mal. Porque cada uno lo hicimos con tanto entusiasmo que hasta Valentina adentro de la panza hacia fuerza para que salieran bien. Son una persona muy especial, te quiero mucho!.

A Gustavo, el Mono. Por enseñarme tantas cosas. Por “presentarme” al pejerrey. Por confiar siempre en mí y en mi trabajo. Espero que podamos seguir compartiendo muchas cosas juntos. Gracias por tu cariño!

A Graciela, mi consejera de Tesis, por su apoyo permanente. Por preocuparte siempre por todos nosotros.

A la gente del laboratorio 3, Graciélita y Ceci, por compartir tanto tiempo juntas, por estar siempre dispuestas a darme una mano, gracias. A Juan, por el trabajo que compartimos juntos. A Fernando y Natalia.

A los pichones del 80, Matías y Luz, porque el entusiasmo y la dedicación que ponen en el trabajo es contagioso. Estoy muy contenta de que estemos trabajando juntos.

A Fabián por darme una mano en la marcación de la busarelina y por tanta buena onda.

Al Gabriel, el Colo y Dani Medesani , por la ayuda que siempre me supieron dar.

A Georgina, por enseñarme los secretos del cultivo celular.

Al Bata por acompañarnos a buscar pejerreyes a Chascomús y preocuparse que llegaran bien.

A toda la gente que conocí en estos años y que siempre me demostraron mucho afecto. Especialmente a Titina, Andrea P., Pablo C. Pablo P., Carina, Juan, Anita, Rafa, Cristian, la gente del 81 y tantos otros que me debo estar olvidando, perdón!!

A mis amigas del alma: Marilú, Andy, Daniela, Georgina, Andrea, y Mariana. Porque ser eso, amigas. Las quiero un montón!!

A Dani y Fer por tantos años de compartir tantas cosas.

A Gus y Paola, Guille, Lili y Lucas, Flavio, Lorna y Mailén. Por su amistad.

A mis hermanos: Mónica, Cecilia, Loni, Juan, Dardo, Marcela y Marina y a Ale. A cada uno de ellos y a sus familias por estar siempre cuando nos necesitamos.

A Roberto, que fue quién me hizo conocer por primera vez esta facultad. por tantos años compartidos que ya se convirtió en un hermano más.

A mis sobrinos: Roberto, Pepe, Mariana, Rodrigo Diego, Cecilia, Sebastián, Carolina, Nicolás, Juan Cruz, Bárbara, Juancito, Sarita, Pedro, Gimena, Melina y Ailén. Porque los quiero mucho.

A mis queridos suegros. Porque siempre están dispuestos a darnos una mano. Pero sobre todo le quiero decirles gracias por tanto amor. Son un lujo de abuelos!!.

A Maia, por cuidarnos y querernos como a sus propios hijos.

A mi Papá que me transmitió el amor por la Ciencia y la Docencia. A mi Mamá por tanto amor cotidiano. A los dos, porque me enseñaron a no bajar nunca los brazos, ni siquiera en el tramo final.

A Fabio, mi gran amor. Porque conservas intacto tus ideales, tus sueños. Porque tu amor me da energía, me protege pero no me ahoga. porque haberte encontrado fue lo más hermoso que me pasó en la vida. Porque tenemos los hijos más hermosos. Gracias porque con vos me pasa esto.....me quedo sin palabras.

A mis hijos, Fermín y Emiliano. Ni juntando todas las palabras del mundo podría escribirles lo que siento por ustedes. Les quiero decir gracias por su sonrisa, sus palabras, sus caricias, porque todo eso me llega tan profundamente al alma, me hace tan feliz!!. Hijos, ustedes son mi vida. Los amo!!!.

El contenido de este trabajo de Tesis ha sido parcialmente publicado en:

Vissio, P.G.; Somoza, G.M.; Maggese, M.C. and Paz D.A. (1995). "Localization of Pituitary Cells by Immunocytochemistry in the "Argentine silver side" *Odontesthes bonariensis*". En *Proceedings of the 5th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Editado por F.W. Goetz & P. Thomas. pp 39.

Vissio, P.G., Somoza, G.M., Maggese, M.C., Strüssmann, C.A. y Paz, D.A. (1997). "Structure and Cell type distribution in the pituitary gland of pejerrey *Odontesthes bonariensis*". *Fisheries Sciences*, vol 63(1), 64-68.

Vissio, P.G., Stefano, A.V., Somoza, G.M., Maggese, M.C. and Paz, D.A. (1999). "Close association among GnRH fibers and GtH, GH, PRL and SL expressing cells in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*". *Fish Physiology and Biochemistry*. 21(2): 121-127.

Stefano, A.V., Vissio, P.G., Paz, D.A., Somoza, G.M., Maggese, M.C. and Barrantes, G.E. (1999). "Colocalization of GnRH binding sites with gonadotropins, somatotropin, somatolactin and prolactin expressing cells of the pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, in vitro". *General and Comparative Endocrinology*. 116, 133-139.

Vissio, P.G., Paz, D.A., & Maggese, M.C. (1999). Estudio de la somatolactina y su relación con el ciclo gonadal en el pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. En 1er Taller integral sobre el recurso pejerrey en la Provincia de Buenos Aires. Ministerio de Asuntos Agrarios, Provincia de Buenos Aires. p. 31-32.

Vissio, P.G., Andreone, L., Paz, D.A., Maggese, M.C., Somoza, G.M. and Strüssmann, C. (2000). "Somatolactin cells in female of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Atherinidae) pituitary. Changes related with the reproductive status". *Proceedings of the 6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Editado por B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson & S.O. Stefansson. pp 494.

INDICE

	<i>página</i>
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUCCION GENERAL.....	6
Hipótesis.....	6
Modelo biológico: el pejerrey.....	12
HIPOTESIS y OBJETIVOS.....	19
CAPITULO I: ESTRUCTURA Y DISTRIBUCION DE LOS DIFERENTES TIPOS	
CELULARES EN LA HIPOFISIS DE PEJERREY.....	20
I-I INTRODUCCION.....	20
I-II OBJETIVO.....	24
I-III MATERIALES y METODOS.....	24
Animales.....	24
Tratamiento de las muestras.....	25
Inmunocitoquímica.....	25
Antisueros.....	26
Controles.....	28
I-IV RESULTADOS.....	29
I-V DISCUSION.....	35
CAPITULO II: ANALISIS DE LAS VARIACIONES DE LAS CELULAS PRODUCTORAS	
DE SL EN LOS DIFERENTES ESTADIOS REPRODUCTIVOS.....	40
II-I INTRODUCCION.....	40
a) Somatotolactina: generalidades.....	40

b) Expresión génica y localización intracelular.....	43
c) Posibles funciones de la SL.....	44
II-II OBJETIVOS.....	51
II-III MATERIALES y METODOS.....	51
a) Caracterización inmunológica de la SL de la hipófisis de pejerrey por Western blot.....	51
SDS-PAGE.....	52
Transferencia.....	53
Western blot.....	54
b) Relación entre el volumen de las células productoras de SL y el estado reproductivo.....	
Animales.....	55
Inmunohistoquímica.....	55
Determinación de las medidas de las células productoras de SL.....	56
Análisis estadísticos.....	57
II-IV RESULTADOS.....	57
a) Caracterización inmunológica de la SL de la hipófisis de pejerrey por Western blot.....	57
b) Relación entre el volumen de las células productoras de SL y el estado reproductivo.....	58
II-V DISCUSION.....	68

CAPITULO III: RELACION ENTRE EL NEUROPEPTIDO LIBERADOR

DE GONADOTROFINAS (GnRH) Y LAS CELULAS PRODUCTORAS DE SL.....	72
III-I INTRODUCCION.....	72
III-II OBJETIVO.....	76
III-III MATERIALES y METODOS.....	77

a) Asociación morfológica entre fibras GnRHérgicas y las células GtH y SL.....	77
Animales.....	77
Procesamiento de las muestras.....	77
Doble inmunomarcación.....	78
Controles.....	79
b) Determinación de sitios de unión a GnRH en gonadotropos y células productoras de SL.....	79
Animales.....	79
Cultivo primario de células hipofisarias.....	80
Radioiodinación de la buserelina.....	81
Test de ligamiento para sitios de unión a GnRH-A en hipófisis de rata.....	82
Localización de los sitios de unión a GnRH.....	83
Inmunocitoquímica.....	84
III-IV RESULTADOS.....	85
Doble inmunomarcación.....	85
Cultivo primario de células hipofisarias.....	86
Caracterización inmunocitoquímica de las células productoras de GtH y SL en cultivo primario de hipófisis.....	87
Localización de los sitios de unión a GnRH en las células ir-GtH e ir-SL.....	87
III-V DISCUSION.....	93
CONCLUSIONES FINALES.....	96
BIBLIOGRAFIA.....	99

RESUMEN

La somatolactina (SL) es una hormona recientemente identificada en peces teleósteos. Por su estructura pertenece a la familia de la hormona de crecimiento (GH) y la prolactina (PRL). Su función es aún poco conocida, pero datos bibliográficos recientes la relacionan entre otros con los procesos reproductivos.

Con el objeto de estudiar su participación en éstos se establecieron los siguientes objetivos:

Estudiar la distribución de los diferentes tipos celulares de la adenohipófisis (ADH) y establecer la presencia de células productoras de SL en el pejerrey, *Odontesthes bonariensis*.

Determinar la relación entre las variaciones morfométricas de las células SL y el ciclo gonadal tanto en machos como en hembras de pejerrey.

Establecer si existe una relación entre SL y el neuropéptido liberador de gonadotrofinas (GnRH).

Los resultados mostraron que las células productoras de las diferentes hormonas hipofisarias se localizaron en sitios específicos de la ADH. Las células productoras de PRL y de ACTH en la pars distalis rostral (PDR), las productoras de hormona de crecimiento (GH), de hormona tirotrófica (TSH) y de gonadotrofinas (GtHs) en la pars distalis proximal (PDP). Estas últimas también se encontraron en el borde externo de la pars intermedia (PI) junto con las células presuntamente productoras de hormona melanocitoestimulante (MSH). Las células secretoras de SL, reconocidas específicamente con cuatro antisueros se ubicaron en estrecha proximidad con la neurohipófisis (NH) también en la PI.

El área de las células productoras de SL mostró diferencias significativas entre hembras activas o vitelogénicas e inactivas o no vitelogénicas. Se observó también una correlación positiva entre el área de las células ir-SL y el Índice gonadosomático (GSI). En machos con altos valores de GSI las células productoras de SL eran más numerosas y de mayor tamaño en comparación con los individuos con valores menores de GSI. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En este trabajo de Tesis se demostró una clara asociación morfológica entre las células productoras de SL y las fibras de GnRH. Por otra parte, se determinó la presencia de receptores a GnRH en estas células, utilizando un cultivo primario de hipófisis de pejerrey. Los sitios de unión se revelaron por autoradiografía de un análogo superactivo de GnRH ($[^{125}\text{I}]\text{GnRH-A}$) y las células inmunoreactivas, ir-SL se identificaron por inmunocitoquímica. Una gran cantidad de gránulos de plata representando sitios de unión de $[^{125}\text{I}]\text{GnRH-A}$ se encontraron asociadas a estas células.

Los resultados obtenidos aportan mayor información a la hipótesis sobre el papel que jugaría la SL en los procesos reproductivos de los peces teleósteos.

Palabras claves: pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, hormonas hipofisarias, inmunocitoquímica, somatolactina, GnRH

ABSTRACT

A pituitary hormone, somatolactin (SL), belonging to the growth hormone (GH)/prolactin (PRL) family is a recently discovered polypeptide produced in the pars intermedia (PI) of teleosts. Its function is still uncertain but several authors propose that SL may be involved in some physiological aspects of reproduction.

In the present work the following objectives were established:

To analyse the distribution of different cellular types in the adenohipophysis (ADH) of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* and to determine the presence of SL producing cells.

To study in both sexes the relationship between morphometric changes of SL producing cells and gonadal development.

To determine the association between ir-GnRH fibers and the SL expressing cells and analyse the presence of GnRH binding sites in the same cells

Results showed that prolactin (PRL) cells were immunostained in the external border of the rostral pars distalis (RPD). Immunoreactive (ir-) corticotrophic (ACTH) cells were identified in the same area and crossreactivity was observed in the pars intermedia (PI), corresponding to presumptive melanocyte-stimulating hormones cells. Ir-growth hormone (GH) cells were identified in close contact with the neurohypophysis (NH) in the proximal pars distalis (PPD). Ir-gonadotrophic (GtH) cells were distributed in the PPD and in the external border of the PI. Ir-thyroid-stimulating hormone (TSH) cells were revealed in the PPD. Ir-somatolactin (SL) cells were recognised specifically using four different antisera in the PI in close contact with the neurohypophysis.

The area of the cells ir-SL showed a significant difference between the area of ir-SL cells of resting/regressing and sexually active (vitellogenic) females. A significant positive correlation between the ir-SL cellular area and the GSI was also observed. In males with the highest GSI values the ir-SL cells appeared more numerous and showed an increase in the immunostained area when compared to those of individuals with lower GSI values. However, the correlation between the area of ir-SL cells and the GSI in males was not statistically significant.

A close association of GnRH fibers and SL cells was determined. In addition, GnRH receptors were observed in SL cells, using a pituitary primary cell culture system. GnRH binding sites were revealed by autoradiography of an iodinated superactive GnRH agonist ($[^{125}\text{I}]\text{GnRH-A}$) and pituitary cells were identified by immunocytochemistry using piscine antisera. Following autoradiography, silver grains representing specific $[^{125}\text{I}]\text{GnRH-A}$ binding were associated with SL cells. These results demonstrate the presence of GnRH binding sites in these cells.

Keywords: pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, pituitary hormones, immunocytochemistry, somatolactin, GnRH

Abreviaturas

ADH	adenohipófisis
NH	neurohipófisis
PDR	pars distalis rostral
PDP	pars distalis proximal
PI	pars intermedia
PRL	prolactina
ACTH	adrenocorticotrofina
GH	hormona de crecimiento
GtH	gonadotrofina
TSH	hormona tirotrófica
MSH	hormona melanocitoestimulante
SL	somatolactina
GnRH	neuropéptido liberador de gonadotrofinas

INTRODUCCION GENERAL

Hipófisis

La hipófisis o pituitaria, es una glándula de secreción interna que se encuentra en todos los vertebrados. El término hipófisis proviene de su ubicación debajo del cerebro (*hypo*: bajo, *physis* : crecimiento). El término pituitaria es antiguo y se refiere a un error conceptual al haber sido considerada como secretora de un mucus viscoso llamado *pituita*.

En todos los vertebrados, el control neuroendócrino de la reproducción se realiza principalmente a través del eje cerebro-hipófisis-gónadas. La hipófisis, se compone de dos partes distinguibles por su origen embriológico, estructura y función: Si bien ambas partes son de origen ectodérmico, la neurohipófisis (NH) se origina a partir de una evaginación del piso del diencéfalo, y la adenohipófisis (ADH) de una evaginación del techo del estomodeo (bolsa de Rathke). Estas partes se ponen en contacto y encierran entre ellas mesodermo, el cual dará origen a los vasos sanguíneos (Ball & Baker, 1969) (Fig. 1). Por lo tanto, la hipófisis es un órgano mixto, con diferentes funciones endócrinas.

La estructura de la hipófisis varía mucho entre los vertebrados (Fig.2). En peces la NH consiste en un tallo hipofisario suspendido de la región ventral del diencéfalo (hipotálamo) que contiene una extensión del tercer ventrículo (receso infundibular). La parte distal del tallo se engrosa y se interdigita en todas las regiones de la adenohipófisis. La ADH posee tres lóbulos: la *pars distalis* rostral (PDR), la *pars distalis* proximal o caudal (PDP) y el lóbulo neurointermedio (LN), que consiste en la *pars intermedia* (PI) más las interdigitaciones e inervaciones de la NH caudal. La NH anterior, homóloga a la eminencia media, inerva la PDR y la PDP (Peter *et al.*, 1990).

Las interdigitaciones en la PI son más profundas y elaboradas que aquellas de la PDR y PDP (Ball & Baker, 1969). La NH es, en general, el sitio de almacenamiento de material sintetizado en el hipotálamo y es transportado por las fibras neurosecretoras que allí se encuentran. Junto a estos axones se encuentran los pituicitos, pero estos no sintetizan ni secretan hormonas.

La circulación sanguínea hacia la ADH consiste en una arteria hipofisaria (o par de arterias) que proveen sangre a los tejidos de la NH y la ADH. Un plexo primario de capilares se forma primero en los tejidos de la NH y a partir de aquí una serie de capilares (sistema centrifugo secundario) pasa a través de la ADH para vascularizar a las células endócrinas. La sangre del sistema secundario drena posteriormente hacia un sistema venoso, que finaliza en una gran vena que sale de la hipófisis. Las terminales neurosecretoras no han sido observadas sobre el plexo primario de capilares en la NH de teleósteos. Incluso en algunas especies donde existe un vestigio de sistema portal, las terminales neurosecretoras no se encuentran sobre este plexo (Peter *et al.*, 1990)..

Dentro de los Craniata solo los myxinoideos, lampreas y teleósteos carecen de un sistema vascular portal (eminencia media), para transportar los neuropéptidos desde el cerebro a la ADH. La importancia adaptativa del sistema portal es que permite una regulación nerviosa central en procesos esenciales, que como la reproducción, están marcados por condiciones cíclicas ambientales externas e internas (Sower, 1998). Los teleósteos han solucionado este problema estructural con una inervación directa a la *pars distalis*, llevada a cabo por neuronas neurosecretoras apropiadas provenientes del hipotálamo adyacente (Peter *et al.*, 1990). Los myxines y lampreas, sin embargo, no poseen comunicación vascular o nerviosa entre el cerebro y la neurohipófisis (Tsuneki & Gorbman, 1975). Esto sugiere que la regulación nerviosa de la *pars distalis* se realiza por difusión de los péptidos cerebrales de la NH adyacente, a través de una fina capa de tejido conectivo que separa el tejido neural del glandular (Sower, 1998).

Evolutivamente, entonces, se podría hablar de tres tipos de regulación nerviosa de la ADH desarrollada en vertebrados: el llevado a cabo por difusión (myxines y lampreas), por inervación directa (teleósteos) y el vascular (resto de vertebrados) (Nozaki *et al.*, 1994) (Fig. 3).

La ADH de los peces teleósteos es por lo tanto un modelo único en vertebrados, ya que sus células están directamente inervadas por las fibras neurosecretoras presentes en la NH. En este caso, la eminencia media se “movilizó” hacia la ADH.

La ADH es el sitio de síntesis, almacenamiento y liberación a la circulación de diferentes hormonas peptídicas: prolactina (PRL), adrenocorticotropina (ACTH), tirotrófina (TSH), gonadotrofinas (GtHs), hormona de crecimiento (GH), hormona melanocitoestimulante (MSH) y somatolactina (SL). De todas estas hormonas, las que mayormente están implicadas en los procesos reproductivos son las GtHs, cuya secreción es estimulada principalmente por el neuropéptido liberador de gonadotrofinas (GnRH). Este neuropéptido, fue caracterizado por primera vez en porcinos y ovinos (mGnRH) (Matsuo *et al.*, 1971; Burgus *et al.*, 1972) y desde entonces se lograron identificar y secuenciar doce variantes más en vertebrados y dos en procordados (ver capítulo 3). Todas son deca péptidos con características comunes.

Aunque las gonadotrofinas son fundamentales en los procesos reproductivos hay otras hormonas hipofisarias como la hormona de crecimiento (GH) y la somatolactina (SL) que parecen jugar también roles importantes (Rand Weaver *et al.*, 1992, Le Gac *et al.*, 1993; Peter & Marchant, 1995).

De la SL, hormona recientemente caracterizada en peces teleósteos (Rand-Weaver, 1991a, 1992), poco es lo que se conoce. Hasta el momento se la ha relacionado con diferentes procesos fisiológicos, pero su función exacta aún no ha sido determinada y poco es lo que se sabe del control de su síntesis y secreción (ver introducción Cap. II).

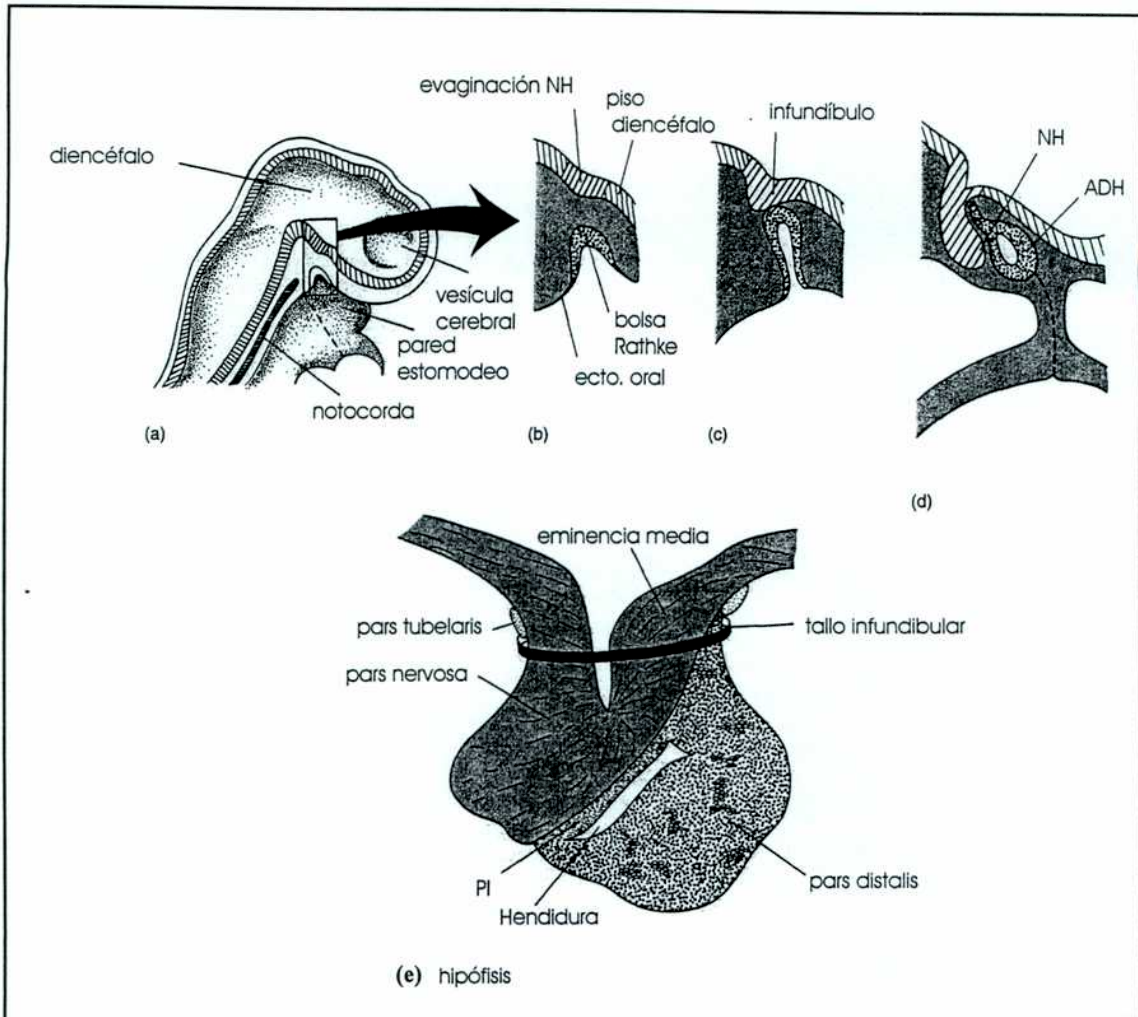


Figura 1: Desarrollo de la hipófisis en vertebrados: (a) sección sagital de un embrión joven, donde se observa la formación de la bolsa de Rathke y el infundíbulo rudimentario. (b-d) los dos divertículos hacen contacto durante el desarrollo embrionario y la bolsa de Rathke pierde contacto con el estomodeo. (e) anatomía de la hipófisis en el adulto. Adaptado de Kardong, 1997.

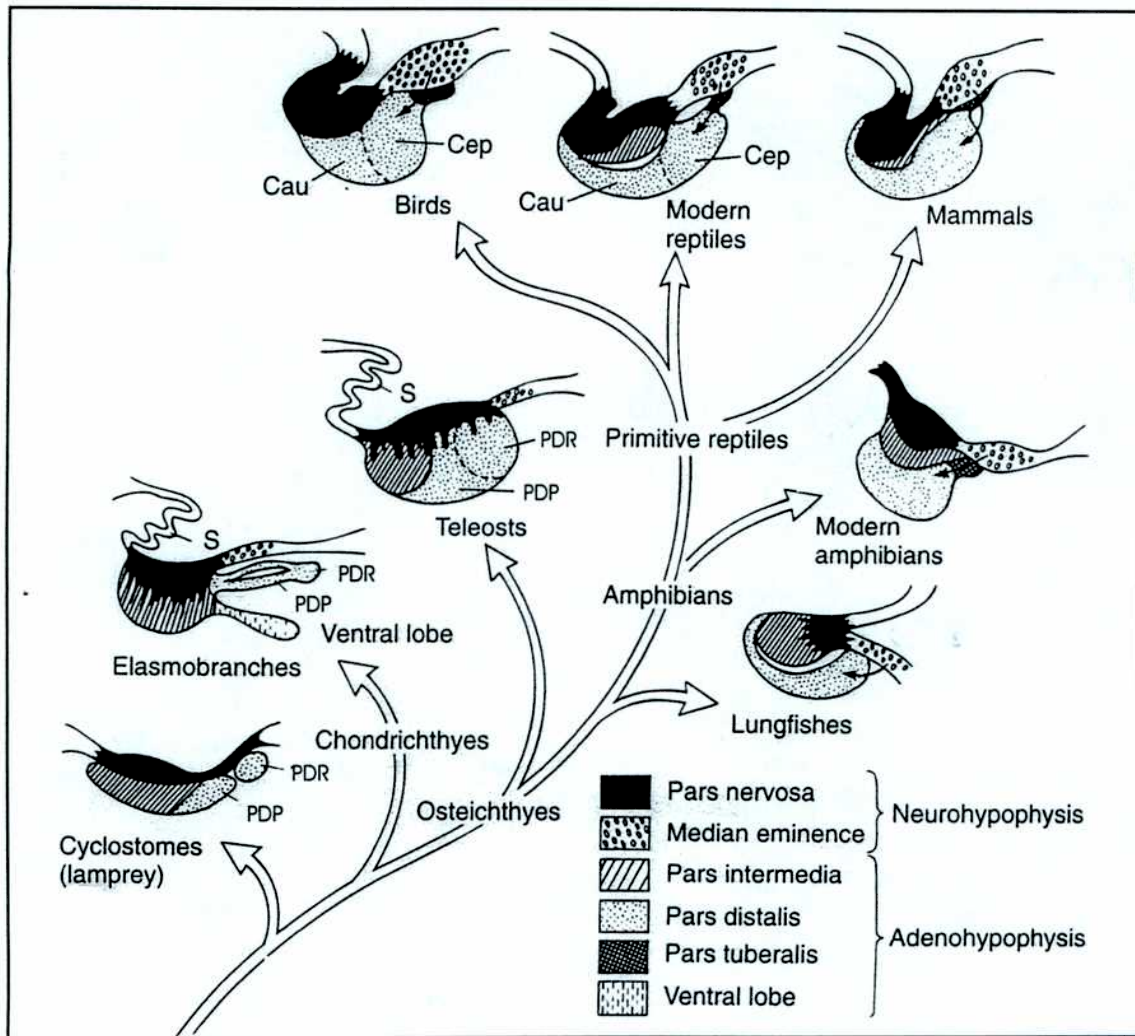


Figura 2: Cambios morfológicos de la hipófisis a lo largo de la evolución de los vertebrados. Las flechas negras dentro de la hipófisis muestran la conexión portal-vascular desde la eminencia media a la pars distalis. La pars distalis muestra una región anterior y posterior: la pars distalis rostral (PDR) y la pars distalis proximal (PDP) o pars distalis cefálica (Cep) y pars distalis caudal (Cau). Adaptado de Kardong, 1997.

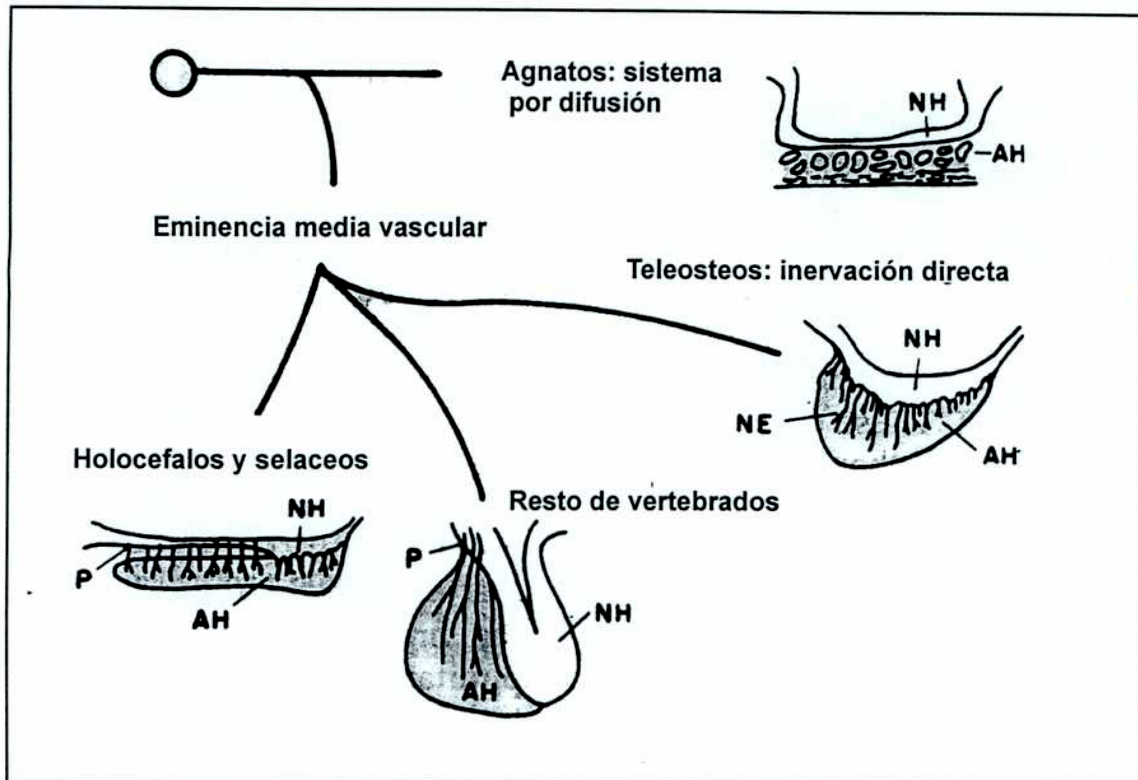


Figura 3: Relación entre la hipófisis y el cerebro de los vertebrados: Representación de los tres tipos de relación entre el cerebro (hipotálamo) y la adenohipófisis de los vertebrados. En los Agnatos, una delgada NH se pone en contacto con la ADH. Entre las dos estructuras se genera un sistema de difusión. En teleósteos, las proyecciones de la NH penetran en la ADH y los axones hacen sinápsis con estas células o cerca, creándose una difusión parácrina. En otros peces, existe un sistema intermedio, en donde unos cortos vasos sanguíneos aparecen en una área de la NH y llegan a la ADH. La eminencia media más desarrollada es la de tetrápodos (anfibios, reptiles, aves y mamíferos), en donde un sistema portal colecta sangre de la NH y la conduce a la ADH. (P: sistema portal). Adaptado de Nozaki et al (1994).

Modelo biológico: el pejerrey

De todos los vertebrados, los teleósteos son los más numerosos, tanto en número de individuos como de especies (aproximadamente 20000 teleósteos versus 4000 mamíferos). Ocupan una gran variedad de ambientes acuáticos y muestran una increíble diversidad de estrategias reproductivas (Trudeau, 1997). Debido a esta gran variabilidad, es importante el estudio de la biología reproductiva de especies autóctonas presenten una importancia económica, tanto real como potencial.

De acuerdo con esto se eligió como modelo biológico para el desarrollo de esta Tesis Doctoral el pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Valenciennes) (Figs. 4 y 5). La clasificación sistemática es la siguiente (Nelson, 1994).

PHYLUM	Chordata
SUBPHYLUM	Vertebrata
SUPERCLASE	Gnathostomata
GRADO	Teleostomi
CLASE	Actinopterygii
DIVISION	Teleostei
SUB DIVISION	Euteleostei
SUPERORDEN	Acanthopterygii
SERIE	Atherinomorpha
ORDEN	Atheriniformes
SUBORDEN	Atherinoidei
FAMILIA	Atherinidae
SUB-FAMILIA	Atherinopsinae
GENERO	<i>Odontesthes</i>
ESPECIE	<i>Odontesthes bonariensis</i>

Presenta un cuerpo hidrodinámico, ahusado, con boca pequeña, cabeza cónica y alargada, ojos con párpados, línea lateral doble e irregular, aleta dorsal doble y coloración plateada, con un peso en adultos promedio de 300 gramos, aunque algunos ejemplares pueden superar el kilogramo. El tipo de alimentación es principalmente planctónica (Ringuelet, 1967).

Es un pez originario de las lagunas de la Provincia de Buenos Aires que posteriormente fue introducido en otras provincias y en distintos países con propósitos de acuicultura y pesca deportiva (Bonetto & Castello, 1985).

El pejerrey, en la Provincia de Buenos Aires y en condiciones naturales, presenta dos períodos de actividad reproductiva: uno en primavera, que puede comenzar en Julio y terminar en Diciembre, con su clímax en los meses de Septiembre y Octubre y un segundo período mas corto en otoño, en los meses de Marzo y Abril (Ringuelet, 1943). Estos períodos se mantienen aún en condiciones de cautiverio (Strüssmann, 1989). La amplitud de los períodos de desove, es variable y elástica, por eso es posible encontrar individuos maduros todo el año (Boschi & Fuster de Plaza, 1959, Strüssmann, 1989). Se la considera una especie promisoría para la acuicultura intensiva, aunque su tasa de crecimiento y supervivencia todavía no son satisfactorias. En la Argentina, se llevaron a cabo intentos de cría intensiva; sin embargo la falta de tradición en la acuicultura, hábitos de alimentación en la población y la abundancia natural de esta especie, limitaron la continuidad de esta tarea. Posteriormente la pesca incontrolada y la ineficiencia en la técnica de cría de alevinos provocó una disminución considerable de las poblaciones naturales.

Hace más de tres décadas el pejerrey fue introducido exitosamente en el Japón desde la Argentina, a partir de huevos obtenidos de reproductores de la Laguna de Chascomús, Provincia de Buenos Aires. En la actualidad, en ese país, se produce pejerrey en forma intensiva. Aunque la producción anual y las poblaciones silvestres

para la pesca deportiva son todavía escasas, esta especie ha sido aceptada inmediatamente para consumo (Del Valle, 1991).

El interés en el cultivo del pejerrey y la poca información sobre su biología han generado la necesidad de realizar estudios básicos para mejorar las tasas de crecimiento, de reproducción y las condiciones de mantenimiento en cautiverio (Strüssmann, 1989). Por lo tanto se consideró importante realizar estudios de la hipófisis y de aquellas hormonas relacionadas o potencialmente relacionadas con la reproducción, ya que estos constituirían la base para el desarrollo de técnicas que permitan una exitosa ovulación y/o espermiación en cautiverio.

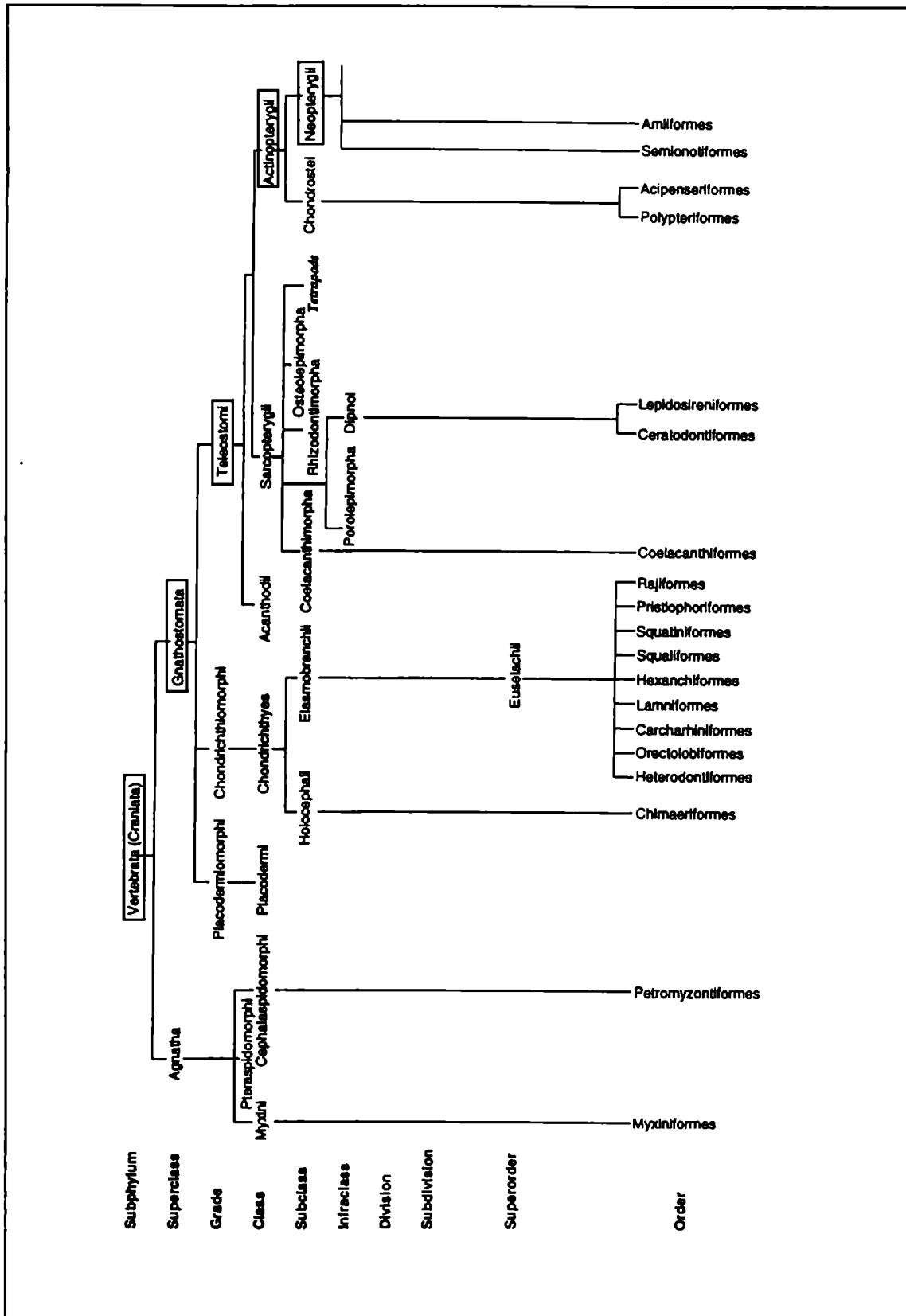


Fig. 4: Arbol filogenético de los peces. Adaptado de Nelson, 1994.

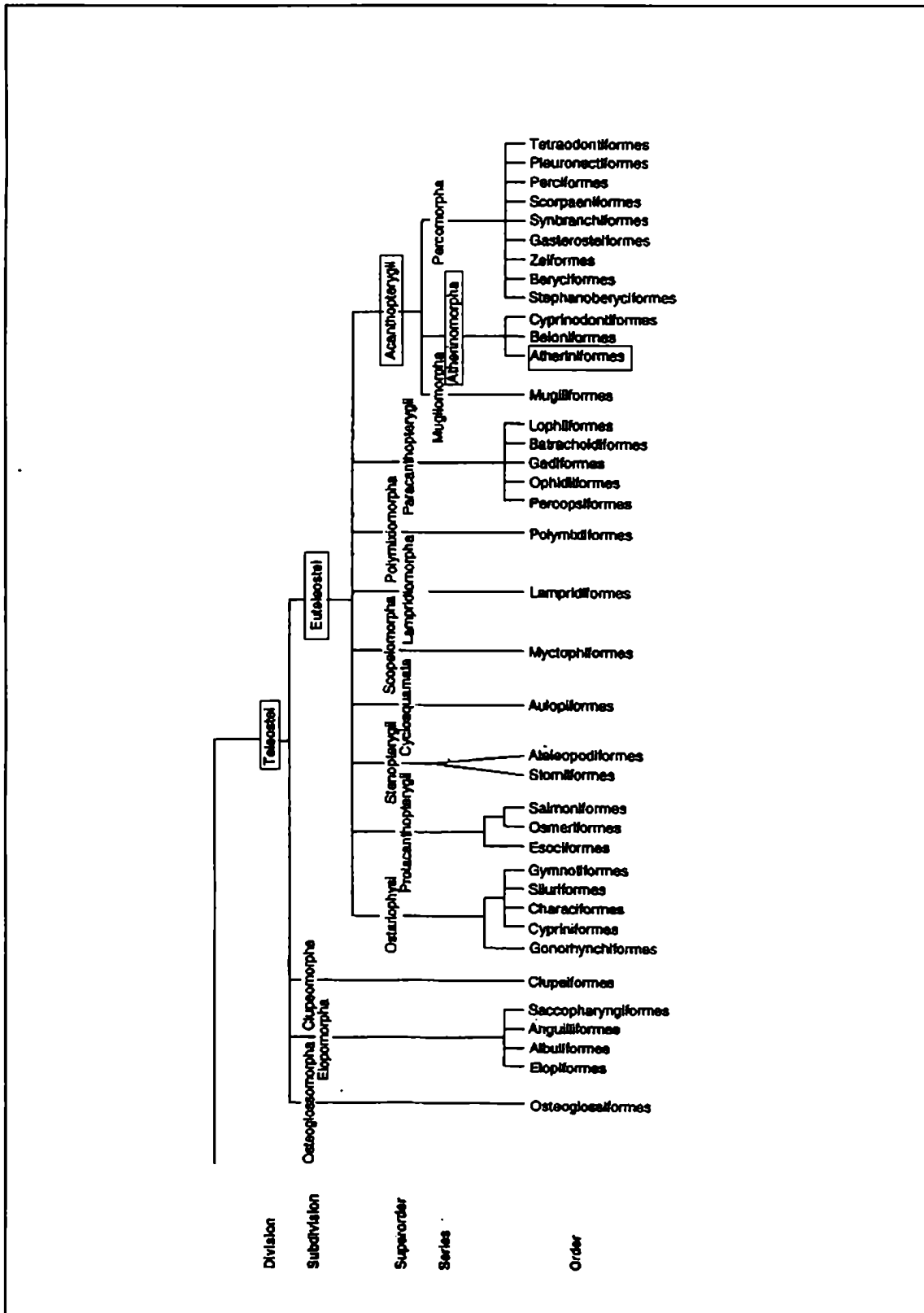


Fig. 4: continuación.

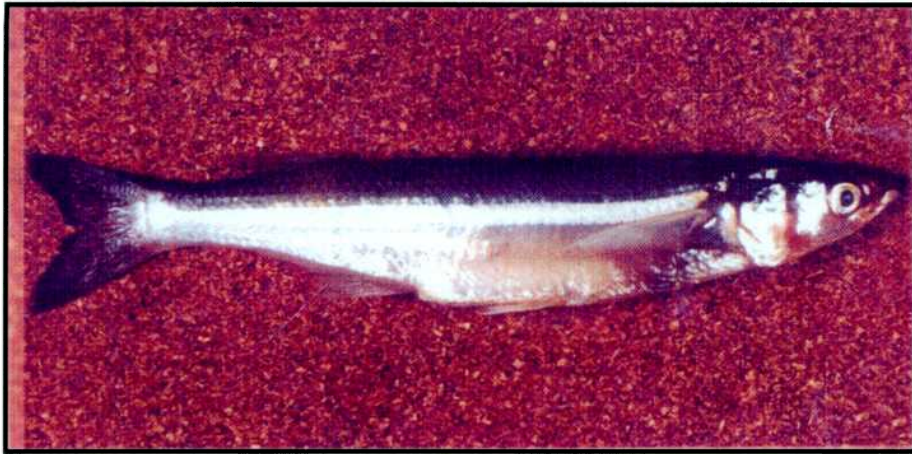


Fig. 5: Ejemplar adulto de pejerrey, *Odontesthes bonariensis*.

En base a lo expuesto en esta Introducción se plantearon las hipótesis de trabajo y los siguientes objetivos:

HIPOTESIS

- **La somatolactina en el pejerrey está involucrada en la fisiología reproductiva.**
- **El neuropéptido liberador de gonadotrofinas (GnRH) regula su síntesis y/o liberación.**

OBJETIVOS

Determinar la estructura y distribución de los diferentes tipos celulares en la hipófisis del pejerrey.

Caracterizar inmunológicamente a la SL de pejerrey y a los antisueros utilizados para su reconocimiento.

Analizar las variaciones de las células productoras de SL en relación con los diferentes estadios reproductivos.

Determinar la relación de SL con el neuropéptido GnRH.

En esta Tesis los objetivos planteados se han analizado en tres capítulos. En el primer capítulo se determinó la estructura y distribución de los diferentes tipos celulares en la hipófisis del pejerrey. En el segundo capítulo se caracterizó inmunológicamente a la SL y se analizaron las variaciones de las células productoras de SL en relación con

los diferentes estadios reproductivos. En el tercer capítulo se determinó la relación entre las células productoras de SL y GnRH.

CAPITULO I: ESTRUCTURA Y DISTRIBUCION DE LOS DIFERENTES TIPOS CELULARES EN LA HIPOFISIS DE PEJERREY.

I-I Introducción

La hipófisis de los peces teleósteos ha sido ampliamente estudiada y los diferentes tipos celulares han sido identificados utilizando en un principio técnicas histoquímicas y ultraestructurales. Si bien estos resultados permiten inferir qué tipo celular se está poniendo en evidencia, las técnicas inmunocitoquímicas desarrolladas a partir de los años '60 permitieron identificar con mayor precisión la naturaleza de los gránulos de secreción presentes en el citoplasma de las células. Dentro de estas técnicas, quizás algunas de las más utilizadas son las de inmunoperoxidasas que utilizan en común el anticuerpo unido a la enzima peroxidasa o bien la reacción biotina-avidina peroxidasa y la enzima es puesta en evidencia mediante una reacción histoquímica indicando así el lugar donde ha actuado el anticuerpo primario.

En contraste a la distribución dispersa que presentan los diferentes tipos celulares de la hipófisis de mamíferos, en los peces teleósteos ésta se encuentra altamente regionalizada (Trudeau, 1997). Las células productoras de las diferentes hormonas se ubican en regiones específicas de la adenohipófisis (PDR, PDP, PI) (Schreibman *et al.*, 1973).

Si bien no se puede generalizar, ya que existen variaciones entre las especies, el esquema básico sería el siguiente: la PDR contiene principalmente células productoras de PRL o lactotropos. Estas células por lo general ocupan una masa compacta, que define principalmente a esta zona. En la mayoría de las especies estudiadas, las células productoras de PRL se extienden ventral y lateralmente hacia la PDP. Sus gránulos se

caracterizan por presentar reacción positiva a la eritrocina con la técnica tetracrómica Aliz B y con el método tricrómico de Cleveland Wolfe, y positivos al azocarmin y la fucsina ácida en métodos como el Azan, Mallory y Masson, pero negativos al ácido peyodico de Schiff (PAS), Alcian blue y aldehído fucsina (AF).

Los corticotropos o células productoras de ACTH se encuentran localizados a lo largo del borde entre la PDR y la PDP o PDR y NH anterior. Reaccionan positivamente con la eritrocina y con el azul de alizarina. También se colorean con hematoxilina plúmbica (PbH) y muestran reacción negativa al PAS y al Alcian blue.

La PDP contiene principalmente a los somatotropos o células productoras de hormona de crecimiento (GH) y los gonadotropos o células productoras de gonadotrofinas (GtH). Las células productoras de GH se caracterizan por ser acidófilas, positivas al Orange G en varias técnicas tricrómicas y tetracrómicas.

Las células productoras de tirotrofinas (TSH) o tirotropos, en varias especies de teleósteos se encuentran distribuidos en la PDR, pero también se los puede encontrar a lo largo de la PDR y el borde de la PDP, en ambas zonas o solamente en la PDP. Son basófilas al igual que los gonadotropos.

Las células productoras de GtH, se ubican en la PDP, a menudo en la parte ventral. En peces maduros se las puede encontrar también en la PDR (Ball & Baker, 1969). Sus gránulos reaccionan positivamente al PAS y a AF, Alcian blue y azul de anilina en las técnicas tricrómicas y tetracrómicas.

Como se mencionara anteriormente las GtHs: GtH I y GtH II se destacan como hormonas claves en la reproducción. Estas hormonas son glicoproteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad α común a las dos gonadotrofinas y a TSH y otra β que le confiere especificidad biológica. El análisis de la secuencia de las subunidades sugiere que GtH I sería homóloga a la hormona foliculoestimulante (FSH) de tetrápodos mientras que GtH II sería homóloga a la hormona luteinizante (LH) de tetrápodos

(Swanson, 1991; Quérat, 1994, 1995). Actúan a nivel gonadal mediante receptores específicos siendo su efecto primario la activación de la síntesis de varios tipos de esteroides sexuales en testículo y ovario (Van der Kraak *et al.*, 1992; Yan *et al.*, 1992). Los niveles en plasma e hipófisis de estas dos GtHs varían marcadamente durante el ciclo reproductivo (Suzuki *et al.*, 1988a), siendo la GtH I la hormona predominante durante la vitelogénesis o espermatogénesis y la GtH II durante la ovulación o espermiación (Suzuki *et al.*, 1987, 1988a).

Las células productoras de GtH son las más estudiadas de la hipófisis de los teleósteos. Se encontraron dos gonadotrofinas diferentes en la hipófisis de diferentes especies incluyendo representantes de los ordenes Salmoniformes, *Oncorhynchus keta* y *Oncorhynchus kisutch* (Swanson *et al.*, 1987; Suzuki *et al.*, 1988b y c), Perciformes, *Micropogonias undulatus* (Copeland & Thomas, 1993), *Pagrus major* (Tanaka *et al.*, 1993), *Katsuwonus plelami* (Koide *et al.*, 1993), *Morone saxatilis* (Hassin *et al.*, 1995), *Thunnus obesus* (Okada *et al.*, 1994), *Sparus aurata* (Elizur *et al.*, 1996) y *Seriola dumerilii* (García-Hernández *et al.*, 1997), en Cyprinodontiformes, *Fundulus heteroclitus* (Lin *et al.*, 1992), Cypriniformes, *Cyprinus carpio* (Van der Kraak *et al.*, 1992) y Pleuronectiformes, *Trichogaster trichopterus* (Jackson *et al.*, 2000). No se han aislado formas tipo GtH-I de *Anguilla anguilla* (Schulz *et al.*, 1995) de varias otras especies de Cypriniformes (Lo *et al.*, 1991) y del Siluriforme, *Clarias gariepinus* (Koide, 1992).

Por otra parte existe una controversia acerca de la existencia de uno o dos tipos celulares productores de gonadotrofinas, es decir algunas células producen GtH I y otras GtH II (Olivereau, 1976; Ueda & Hirashima, 1979) o si es una única célula en diferentes estadios de actividad sintética (Ekengren *et al.*, 1978; Peute *et al.*, 1978).

En la PI se encuentran en general las células productoras de MSH junto con las productoras de SL o somatolactínicas (Batten, 1986; Cambré *et al.*, 1986; Peter *et al.*,

1990; Yan & Thomas, 1991; García-Hernández, 1996). Los primeros estudios histológicos revelaban que la PI de la mayoría de los teleósteos contenía dos tipos celulares diferentes, uno bordeando la NH, positivo a PbH y negativo a la coloración PAS, mientras que el otro tipo celular que bordeaba a la NH era PbH negativo y usualmente PAS positivo, llamado PIPAS, células PAS positivas de la PI. Con el desarrollo de las técnicas inmunocitoquímicas y la purificación de la SL se pudo determinar que estas células PIPAS eran las células productoras de SL distinguibles de las células MSH las cuales son PAS negativas. Sin embargo, en salmónidos las células productoras de SL son PAS negativas. Por lo tanto la SL puede existir en forma glicosilada o no glicosilada, dependiendo de la especie. Rand-Weaver *et al.*, (1991a) aislaron por primera vez esta hormona de la hipófisis del bacalao, *Gadus morhua* y desarrollaron antisueros específicos. Esto permitió demostrar la localización exacta de estas células (Rand-Weaver *et al.*, 1991b). Hasta el momento las células productoras de SL han sido identificadas en pocas especies de peces teleósteos: en Gadiformes, *Gadus morhua*; Siluriformes, *Heteropneustes fossilis*, Anguiliformes, *Anguilla anguilla*, Cyprinodontiformes, *Fundulus heteroclitus* y *Poecilia latipinna* (Rand-Weaver *et al.*, 1991b), en Pleuronectiformes, *Pleuronectes flesus* (Rand-Weaver *et al.*, 1991b) y *Pleuronectes vetulus* (Johnson *et al.*, 1997), Salmoniformes, *Oncorhynchus nerka* y *Oncorhynchus keta* (Olivereau & Rand-Weaver, 1994a), *Oncorhynchus mykiss* (Rand-Weaver *et al.*, 1991b, Kaneko *et al.*, 1993a); *Oncorhynchus tshawytscha* (Olivereau & Rand-Weaver, 1994b), Perciformes, *Sciaenops ocellatus* (Zhu & Thomas, 1995); *Seriola dumerilii* (García-Hernández *et al.*, 1996), *Oreochromis mossambicus* (Dores *et al.*, 1996) y *Oreochromis niloticus* (Mousa & Mousa, 1999a).y en el orden Synbranchiformes, *Synbranchus marmoratus* (Vissio *et al.*, 1996).

La hipófisis de pejerrey fue previamente descrita por Calvo & Morriconi (1974), quienes identificaron seis tipos celulares utilizando técnicas histoquímicas

clásicas. Si bien este estudio permite una buena aproximación a la morfología de esta glándula, no discrimina fehacientemente la naturaleza de los gránulos de secreción. Por lo tanto, con el fin de analizar con mayor precisión la distribución de los diferentes tipos celulares, se planteó el estudio de la hipófisis del pejerrey utilizando técnicas inmunocitoquímicas

I-II Objetivo

- Determinar la estructura y distribución de los diferentes tipos celulares en la hipófisis del pejerrey.

I-III Materiales y métodos

Animales

Aproximadamente 20 ejemplares de pejerrey, juveniles y adultos, provenientes de la laguna de Chascomús (Provincia de Buenos Aires, Argentina) fueron capturados con red de enmalle y procesados inmediatamente. Otro grupo de peces fue colectado durante la estación de cría en la laguna Salada Grande (Provincia de Buenos Aires) y un tercer grupo, criado en estanques externos de la Saitama Prefecture Fisheries Experimental Station (Saitama Prefecture, Japon), fue provisto por el Dr. C. Strüssmann.

Tratamiento de las muestras

Los ejemplares fueron anestesiados con benzocaína disuelta en agua (0.1 g/l) y decapitados.

Los cerebros junto con las hipófisis se extrajeron a través de una incisión dorso-longitudinal de la cabeza. El cerebro junto con la hipófisis fueron disecados en el fijador, y permanecieron aproximadamente 20 horas en la solución fijadora hasta que ésta se reemplazo por alcohol 70%

Los fijadores utilizados fueron Bouin (solución ácido pícrico 70%, formol 25%, ácido acético 5%) y Bouin Hollande. No se observaron diferencias en la inmunomarcación ni entre los dos fijadores ni entre las muestras marcadas inmediatamente (muestras provenientes de Chascomús o de Salada Grande) y las muestras mantenidas en cortes de parafina sin marcar por aproximadamente diez años (Saitama). Luego de deshidratadas, las muestras se embebieron en parafina. Los cortes parasagittales de aproximadamente 5-7 μm se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados.

Immunocitoquímica

Los cortes fueron inmunomarcados utilizando la técnica Avidina-Biotina Peroxidasa (ABC). (Sigma, St. Louis, MO), desparafinados, utilizando xileno e hidratados en una serie decreciente de alcoholes (100%, 96%, 90%, 70%) hasta llegar a buffer fosfato salino, pH: 7.6 (PBS). Luego se procedió a bloquear las peroxidases endógenas con una solución al 3% de H_2O_2 por 5 min. Al cabo de este tiempo los cortes fueron lavados nuevamente en PBS y se realizó un bloqueo con suero normal de caballo (Vectastain, Vector Lab.) por 45 min, con el objeto de eliminar las marcaciones

inespecíficas. Al cabo de este tiempo y luego de un lavado en PBS se incubaron con el antisuero específico a la dilución adecuada (Tabla 1) durante toda la noche a 4°C. La dilución utilizada para cada antisuero se determinó experimentalmente, probando un amplio rango de diluciones y seleccionando la más diluida en la cual se detectaba una buena marca con un mínimo de coloración inespecífica de fondo (background). Luego de la incubación con el antisuero adecuado, los cortes fueron lavados en PBS, y se les realizó un segundo bloqueo con suero normal de caballo, se los lavó y se los trató con el antisuero secundario biotinado por una hora a temperatura ambiente. Luego de transcurrido este tiempo, se volvieron a lavar en PBS, y se trataron con el complejo Avidina-estreptoavidina (ABC). La actividad peroxidasa fue demostrada por incubación de los cortes en una solución 0.03% de 3,3' diaminobencidina en buffer Tris, pH: 7.6 y 0.02% de H₂O₂. Algunas muestras fueron contracoloradas con hematoxilina, antes de ser montadas en DPX (Fluka).

Antisueros

Se utilizaron los siguientes antígenos y antisueros: Chum salmon *Oncorhynchus keta* PRL (chumPRL) y su respectivo antisuero anti-chum PRL, chum salmon GH (chumGH) y anti-chum GH, chum salmon SL (chumSL) y anti-chum SL, chum salmon GtH Iβ y GtH IIβ (chum GtH Iβ y GtH IIβ) y anti-chum GtH Iβ y GtH IIβ, todos estos donados generosamente por el Dr. Kawauchi (School of Fisheries Sciences, Kitasato University, Iwate, Japon). Anti-carpa *Cyprinus carpio* GH (cGH) y anti-carpa prolactina (cPRL) fueron donados por el Dr. R.E. Peter (University of Alberta, Edmonton, Canada). Anti-croaker en estadio maduro *Micropogonias undulatus* GtH (crGtH) y anti-red drum *Sciaenops ocellatus* SL (rdSL) generosamente donados por el Dr. Peter Thomas (Marine Science Institute, The University of Texas at Austin, Texas, USA).

Anti-TSH humana (hTSH), anti-PRL humana (hPRL) y anti- ACTH humana sintética, 1-24 (hACTH) fueron adquiridas a Dako (DAKO, Dinamarca). Anti-coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* SL donado por la Dra. M. Rand-Weaver (Brunel University, Uxbridge, Middlesex, Inglaterra) y anti-SL recombinante de *Sparus aurata* (saSL) donado por el Dr. A. Astola, (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Cádiz, España). En todos los casos los antisueros fueron diluidos en PBS pH 7.6.(Tabla 1)

Antisuero	Dilución	Elevado en:	Elevado contra:	Procedencia
anti-chum salmon PRL	1:1000	Conejo	PRL de <i>O. keta</i>	Dr. H. Kawauchi
anti-c PRL	1:1000	Conejo	PRL de <i>C. carpio</i>	Dr. R.E. Peter
anti-h PRL	1:100	Conejo	PRL humana	DAKO. Denmark
anti-chum salmon GH	1:1000	Conejo	GH de <i>O. keta</i>	Dr. H. Kawauchi
anti-carpa GH	1:1000	Conejo	GH de <i>C. carpio</i>	Dr. R.E. Peter
anti-hTSH	1:500	Conejo	Subunidad β TSH humana	DAKO. Denmark
anti-hACTH	1:2000	Conejo	aa. 1-24 de la ACTH humana	DAKO. Denmark
anti-crGtH	1:500	Conejo	GtH de <i>M. undulatus</i>	Dr. P. Thomas

anti-chum salmon GtH I	1:2000	Conejo	GtH I de <i>O. keta</i>	Dr. H. Kawauchi
anti-chum salmon GtH II	1:2000	Conejo	GtH II de <i>O. keta</i>	Dr. H. Kawauchi
anti-chum salmon SL	1:1000	Conejo	SL de <i>O. keta</i>	Dr. H. Kawauchi
anti-rdSL	1:1000	Conejo	SL de <i>S. ocellatus</i>	Dr. P. Thomas
anti-coho salmon SL	1:2000	Conejo	SL de <i>O. kisutch</i>	Dr.M. Rand- Weaver
anti-sa SL	1:2000	Conejo	SL de <i>Sparus aurata</i>	Dr. Astola

Tabla 1: Características y dilución de los antisueros utilizados:

Controles

La especificidad de los antisueros utilizados fue validada por preadsorción con exceso de antígeno (24 h a 4°C), en los casos en los cuales se disponía del antígeno correspondiente (GtH I, GtH II, GH y SL), o por el uso de más de un antisuero (PRL, GH y SL). En todos los casos, cortes controles se incluyeron en el mismo portaobjeto, en los cuales el antisuero primario fue reemplazado por PBS.

La ubicación de los diferentes tipos celulares fue similar a la encontrada por otros autores en otras especies. Esto también validaría la especificidad de los antisueros utilizados.

I-IV Resultados

La hipófisis de *Odontesthes bonariensis* se encuentra suspendida del diencéfalo por detrás del quiasma óptico. Está conectada al tercer ventrículo por un tallo que se ramifica en la ADH formando la NH. El tamaño es variable. Básicamente, se reconocen tres áreas en la ADH: la PDR, la PDP y la PI. La NH se interdigita en todas las regiones pero mucho más marcadamente en la PI.

La PDR se caracterizó por la presencia de células inmunoreactivas a PRL (células ir-PRL) y células inmunoreactivas a ACTH (ir-ACTH). Las células ir-PRL se identificaron con anti-chum PRL y anti-carpaPRL, pero no se obtuvo inmunomarca cuando se utilizó anti h-PRL. La mayoría de las células ir-PRL se localizaron en un grupo compacto en la periferia de la PDR (Fig. 6a), pero algunas células aisladas se encontraron en la PDP, y en la PI. Las células ir-ACTH, reveladas con anti-hACTH se distribuyeron en el lado interno de la PDR bordeando a la NH (Fig.6b). Una intensa inmunomarcación también se detectó en la PI .

La PDP se caracterizó por la presencia de células ir-GH, ir-GtH e ir-TSH. Las células ir-GH se reconocieron utilizando dos antisueros, anti-chum GH y anti-carpaGH. Ambos antisueros reconocen el mismo grupo de células rodeando las interdigitaciones de la NH (Fig.6c). Las células ir-GtH se localizaron en la PDP y en el borde externo de la PI (Fig. 7a) con los diferentes antisueros utilizados (anti-crGtH, anti-chum GtH I β o GtH II β).

Se realizaron dos estrategias diferentes para determinar si ambas gonadotrofinas se expresan o no en la misma célula: 1) Se inmunomarcaron dos cortes adyacentes, uno con anti-chum GtH I β y el otro con anti-chum GtH II β , y luego se los comparó a alta magnificación, 2) Otros cortes se inmunomarcaron con anti-chum GtH I β preadsorbido con chum GtH II β y anti-chum GtH II β preadsorbido con chum GtH I β . Sin embargo

fue difícil distinguir claramente si ambas gonadotropinas se expresan en una o dos células diferentes, ya que aunque secciones adyacentes inmunomarcadas con anti-chum GtH I β o anti-chum GtH II β mostraron un patrón diferente (Fig. 7b y 7c) también aparecieron otras células inmunomarcadas con ambos antisueros. Por otra parte, no se obtuvo inmunomarca cuando se utilizó anti-chum GtH I β preadsorbido con chum GtH II β y anti-chum GtH II β preadsorbido con chum GtH I β .

Las células ir-TSH se pusieron en evidencia utilizando anti-hTSH. Aparecen pocas y dispersas en la PDP (Fig. 8c). Cuando la concentración de anti-hTSH se incrementó, se observaron células inmunomarcadas en otras regiones, probablemente células productoras de GtH.

Las células ir-SL fueron identificadas utilizando cuatro antisueros diferentes: anti-chum salmon SL, anti-rdSL, anti-saSL y anti-coho salmon SL. En todos los casos las células inmunomarcadas fueron las mismas y aparecieron en la PI (Fig. 8a). Estas células se caracterizaron por presentar forma elongada, con núcleo periférico. Algunos antisueros revelaron las células productoras de SL con un background mínimo, sin embargo otros antisueros produjeron un background suave en las células vecinas (Fig. 8b). La preadsorción con chumSL suprimió completamente la inmunomarca de anti-chum salmon SL y anti-rd SL.

Los resultados obtenidos se resumen en la Fig. 9.

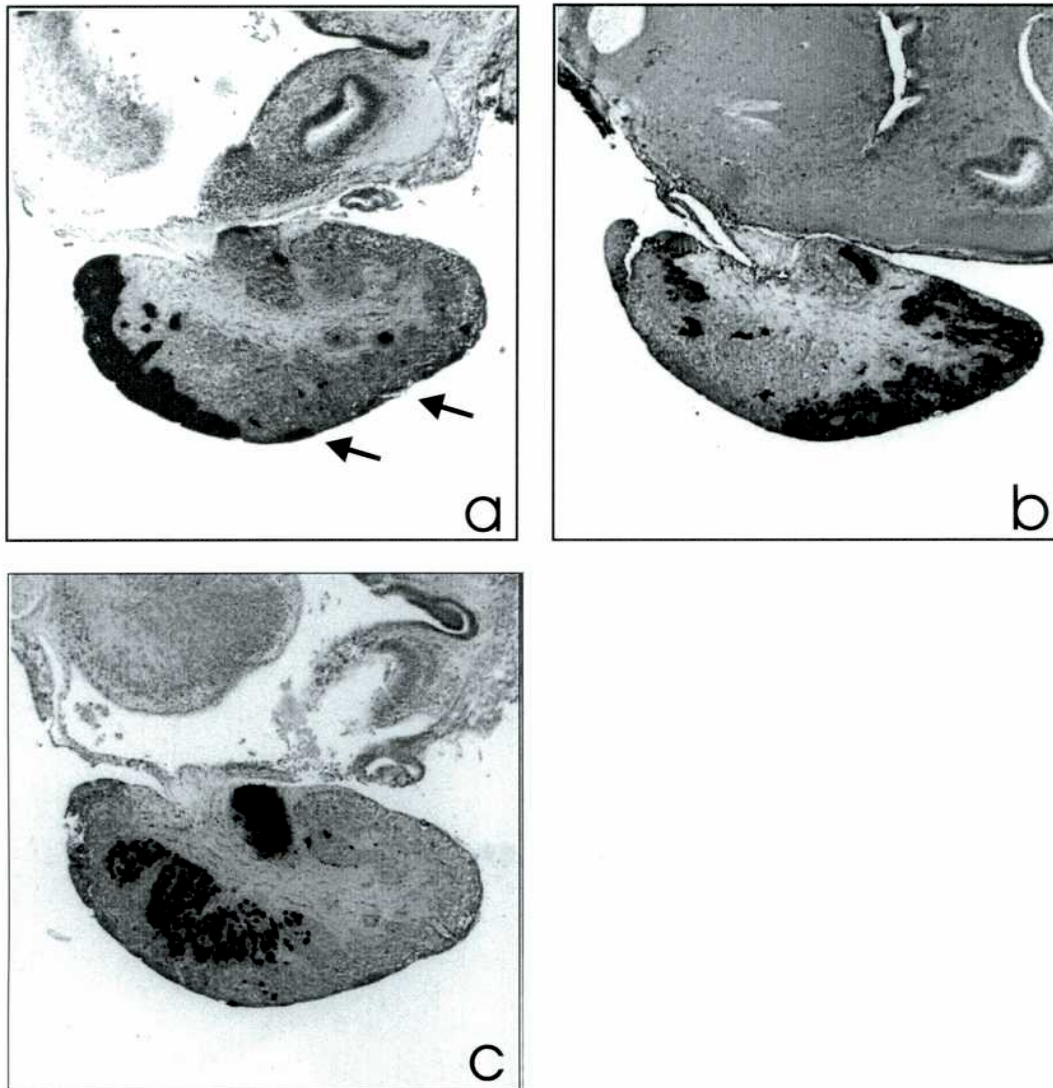


Fig. 6: Cortes parasagiales de hipófisis de pejerrey. La PDR se encuentra a la izquierda, x64, a) Inmunomarcación de células productoras de PRL, con anti-chum salmon PRL. Obsérvese la inmunomarcación en la PDP y en la PI (flecha), b) Inmunomarcación de células productoras de ACTH con anti-hACTH. En la PI se observa una gran área inmunomarcada, probablemente poniéndose en evidencia las células productoras de MSH, c) Células productoras de GH, innumeradas con anti-chum salmon GH en la PDP.

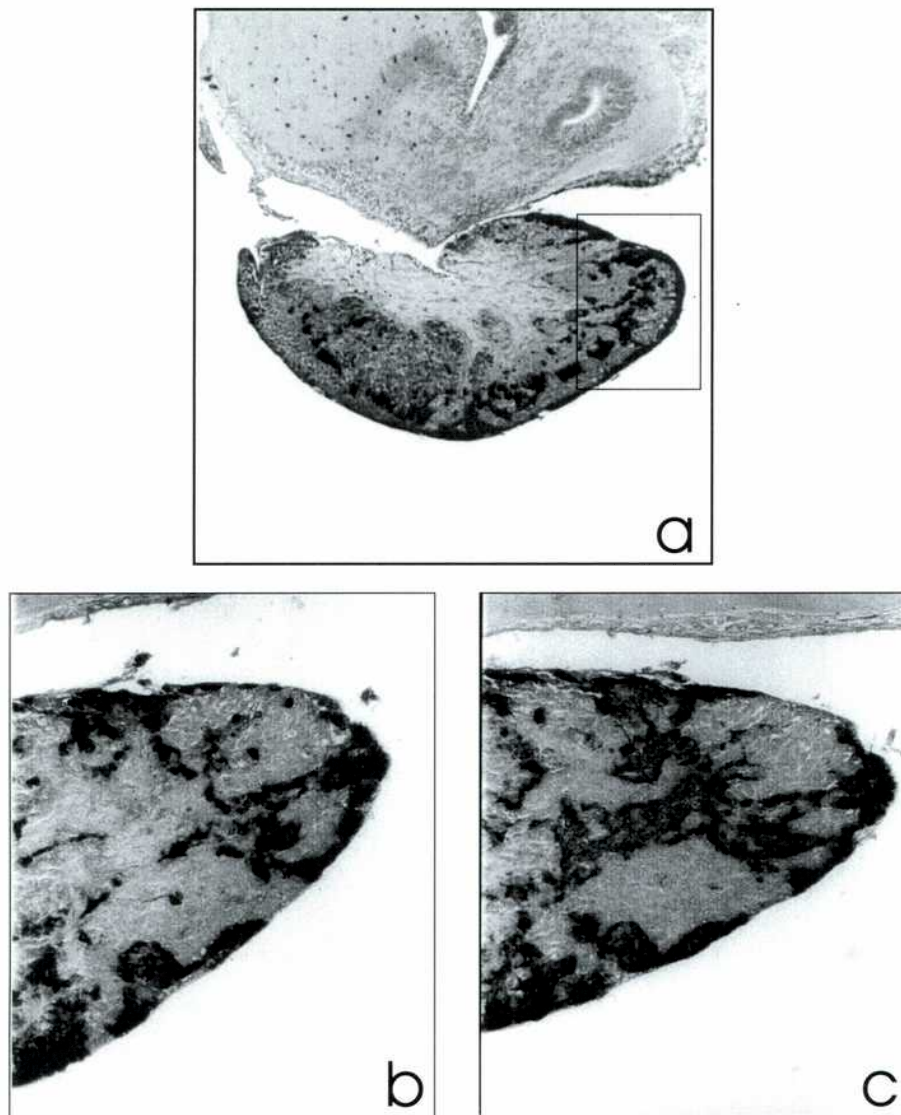


Fig. 7: Cortes parasagitales de hipófisis de pejerrey. a) Inmunomarcación de células gonadotróficas con anti-crGtH, x64, b) y c) Secciones adyacentes (correspondientes a la zona indicada en el corte a) inmunomarcadas con anti-chum salmon GtH I y anti-chum salmon GtH II respectivamente, x200.

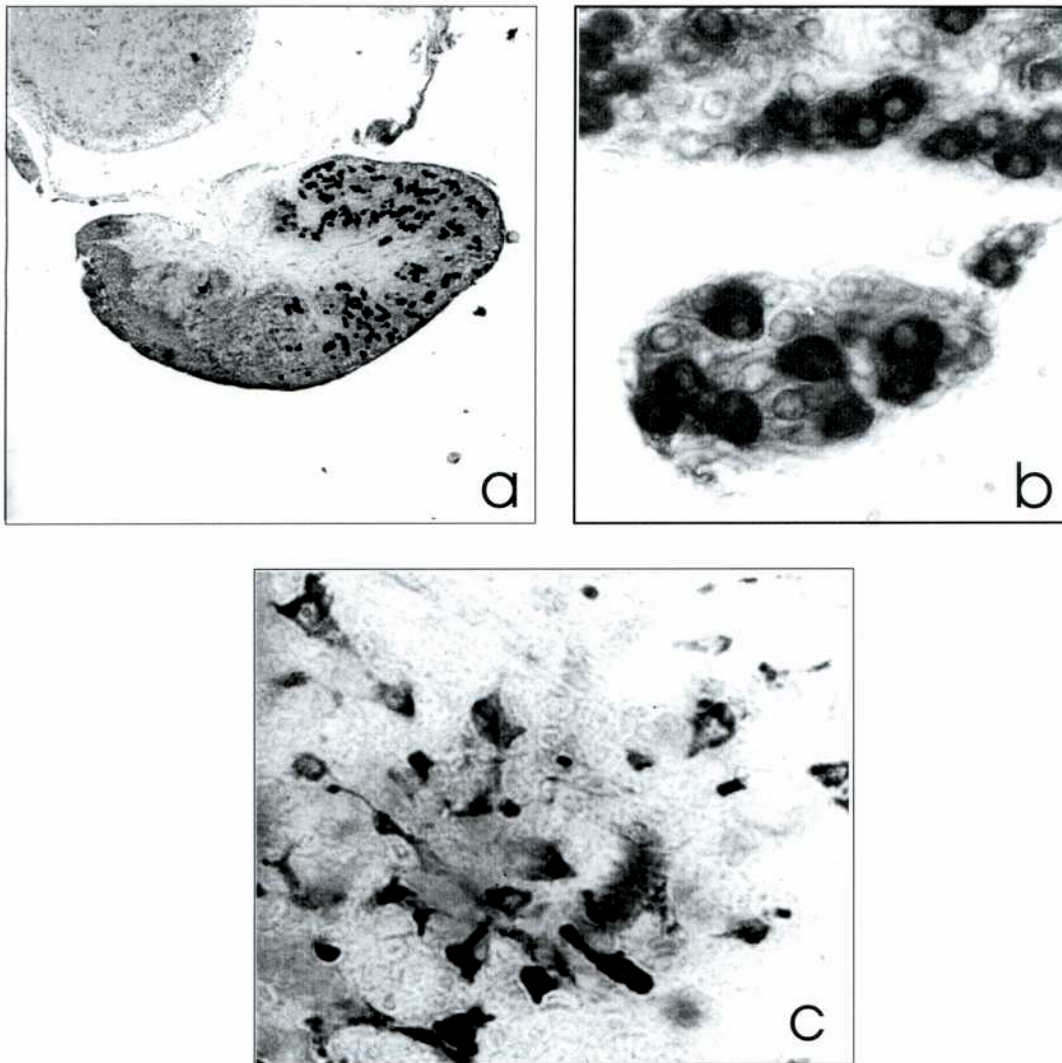


Fig. 8: Cortes parasagittales de hipófisis de pejerrey. a) Resultado de la inmunomarcación con anti-rd SL, donde se ven la células ir-SL en la PI (x64), b) Detalle de las células productoras de SL inmunomarcadas con anti-chum salmon SL. Notese la difusa inmunomarcación de las células vecinas (x1000), c) Detalle de las células ir-TSH en la PDP inmunomarcadas con anti-hTSH (x400).

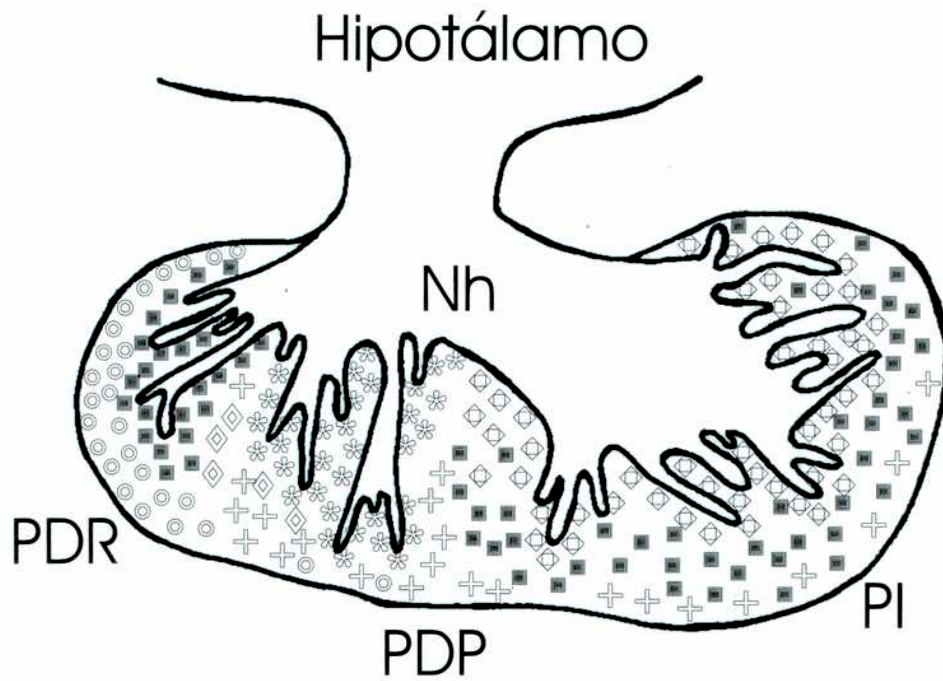


Fig. 9: Diagrama de una sección sagital de hipófisis de pejerrey, mostrando la distribución de los diferentes tipos celulares. Células ir-PRL (⊙), células ir-ACTH (en PDR) o MSH (■), células ir-GH (*), células ir-TSH (◇), células ir-GtH (+) y células ir-SL (◊).

I-V Discusión

Aunque la hipófisis de peces ha sido estudiada desde hace mucho tiempo, la anatomía y distribución celular de la misma se conoce en un grupo reducido de especies. Por ejemplo, la identificación y distribución de los tipos celulares en la hipófisis de los peces Atheriniformes fue solamente estudiada en una sola especie marina, *Austromenidia laticlavia*, y en este caso solo se utilizaron antisueros desarrollados a partir de hormonas de mamíferos (Siegmund *et al.*, 1987). En nuestro caso, con la excepción de los antisueros, anti-hTSH y anti-1-24hACTH, la identificación se llevó a cabo con antisueros contra hormonas de peces.

Las ubicación de las células ir-PRL y las ir-ACTH en la PDR fue coincidente con las descripciones realizadas en otros teleósteos (Batten y Schreibman, 1986; Yan & Thomas, 1991; Vissio *et al.*, 1996). Las células ir-PRL se identificaron con dos antisueros diferentes desarrollados a partir de PRL de peces y al igual que lo que sucedió en *Austromenidia laticlavia* (Siegmund *et al.*, 1987), anti-hPRL fue incapaz de reconocer a los lactotropos. Las células ir-PRL aparecieron como un grupo compacto en la periferia de la PDR. Ambos antisueros reconocieron también un pequeño grupo de células en la PI. Esto podría deberse a la similitud estructural existente entre la PRL y la SL (Rand-Weaver *et al.*, 1991a; Takayama *et al.*, 1991a y b). No se pudo determinar si esta inmunoreactividad en células de la PI se debió a la presencia de células productoras de PRL o a alguna clase de reacción cruzada con las células productoras de SL.

Las células ir-ACTH en la PDR se inmunomarcaron con un antisuero comercial desarrollado en conejo a partir de los aminoácidos 1-24 de la ACTH humana. Se determinó también una gran reacción positiva con las células presumiblemente MSH de la PI. Esto ha sido informado también para otras especies (Munro, 1985; Cambré *et al.*, 1986; Siegmund *et al.*, 1987; Yan & Thomas, 1991). Esta reacción cruzada podría

deberse a que MSH comparte epitopes con ACTH (Follénus & Dubois, 1980) ya que ambas moléculas derivan de un precursor común, la proopiomelanocortina (POMC).

La distribución de las células productoras de GH, identificadas con dos antisueros desarrollados a partir de GH de peces, siguió el mismo patrón descrito en otras especies de teleósteos. A pesar de la relación entre GH y SL (Rand-Weaver *et al.*, 1991a; Takayama *et al.*, 1991a y b), no se han observado células inmunomarcadas en la PI.

En cuanto a las células ir-GtH, se distribuyeron en el centro y el borde ventral de la PDP y en el borde externo de la PI en el pejerrey. Calvo & Morriconi, (1974) ya habían descrito por técnicas histoquímicas la presencia de estas células supuestamente productoras de gonadotropinas en la PI del pejerrey. Aunque se sugirió como inusual la presencia de GtH en la PI (Yan & Thomas, 1991), se encontró en otras especies de teleósteos (Cambré *et al.*, 1986; Yan & Thomas, 1991, García Hernández *et al.*, 1996), incluyendo a *Austromenidia laticlavia* (Siegmund *et al.*, 1987). En el caso de *Lepomis* y de *Dicentrarchus labrax* (orden Perciformes) se comprobó que estas células no son parte de la PI sino que la PI se encuentra rodeada por pequeñas porciones de la *pars distalis* (Simon & Reinboth, 1974; Cambré *et al.*, 1986). En el caso del pejerrey no se puede descartar la posibilidad de que estas células en realidad se encuentren en extensiones de la *pars distalis*, sin embargo sería necesario analizarlo con microscopía electrónica para confirmarlo.

Dos formas de GtH (GtH I y GtH II homólogas a FSH y LH) fueron identificadas utilizando anti-chum GtH I β , anti-chum GtH II β y anti-crGtH. Los cortes adyacentes inmunomarcados con anti-chum GtH I β y con anti-chum GtH II β generalmente mostraron diferentes patrones, aunque algunas áreas fueron reconocidas por ambos antisueros. Esto sugeriría que existen células que expresan GtH I y células que expresan GtH II, como se describió en salmónidos (Nozaki *et al.*, 1990) y células

que expresarían ambas gonadotrofinas como en el platifish (Cyprinodontiformes) (Schreibman *et al.*, 1990). Se intentó resolver esta cuestión realizando los experimentos de preadsorción descritos previamente. Sin embargo, cuando se preadsorbieron anti-chum GtH I β con chum GtH IIB y anti-chum GtH IIB con chum GtH I β se abolió totalmente la marcación. Resultados similares han sido obtenidos con anti-coho salmon GtH I y GtH II preadsorbidos con coho GtH II y GtH I respectivamente (Nozaki *et al.*, 1990). La razón exacta por la que esto ocurre no se conoce. Una posibilidad sería que la estructura tridimensional de la subunidad β de ambas gonadotrofinas sea muy similar (Nozaki *et al.*, 1990). Por otro lado ninguno de los dos antisueros reconoce a las células presumiblemente productoras de TSH a pesar de que estas hormonas están estructuralmente relacionadas.

Las células ir-TSH fueron identificadas en la PDP utilizando anti-hTSH β , ya utilizado previamente para la identificación de estas células en otras especies de teleósteos (Ueda *et al.*, 1983, Batten & Schreibman *et al.*, 1986, Yan & Thomas *et al.*, 1991, Vissio *et al.*, 1996)

Las células ir-SL fueron identificadas con cuatro antisueros diferentes, en la PI. Los estudios inmunohistoquímicos realizados hasta el momento, tanto en teleósteos de agua dulce como en marinos, muestran que las células productoras de SL se encuentran allí. Aunque la SL esta estructuralmente relacionada con GH y PRL, la distribución de las células productoras de SL es claramente diferente. Estudios previos en otras especies demuestran que estas células pueden ser detectadas con antisueros contra GtH de peces (Margolis-Kazan & Schreibman, 1981; Batten, 1986), antisuero contra PRL de peces, y antisueros contra lactógeno placentario (PL). Esta inmunoreactividad cruzada se debe a la similitud en la estructura de estas moléculas. En el pejerrey ningún tipo de reacción cruzada se observó entre SL y moléculas estructuralmente relacionadas.

Resulta interesante destacar que recientemente Mousa & Mousa (1999a) han

descripto la presencia de células ir-SL ampliamente distribuidas en el cerebro de *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). Según los autores, estas células se extienden a todo lo largo del cerebro, desde el bulbo olfatorio hasta la médula oblongata, pero no se describen fibras inmunoreactivas, por lo que no es posible inferir que células inervarían y que función cumpliría la SL cerebral. En nuestro laboratorio y trabajando con el mismo antisuero (anti-chum salmon SL) usado por Mousa & Mousa en 1999a y con otros tres antisueros (ver tabla 1) no se ha podido detectar inmunomarca a nivel cerebral. Además en trabajos recientes llevados a cabo en nuestro laboratorio en *Cichlasoma dimerus*, una especie de la misma familia que *O. niloticus*, usando los cuatro antisueros disponibles contra SL tampoco fue posible identificar células inmunoreactivas a nivel cerebral. Por lo expuesto se deduce que son necesarios nuevos estudios con el objeto de confirmar la presencia de SL a nivel cerebral.

Los resultados de este estudio permiten concluir que el patrón de distribución de los diferentes tipos celulares en la hipófisis del pejerrey es bastante similar a lo observado en otros grupos de teleósteos, aunque algunos autores han informado sobre la presencia de TSH (Fridberg *et al.*, 1981; Nozaki *et al.*, 1990) y GtH (Olivereau & Nagahama, 1983) en la PDR de algunas especies. Asimismo estos resultados sirvieron de base para los estudios planteados posteriormente.

En salmónidos, Olivereau & Rand-Weaver (1994a) observaron un aumento de las células ir-SL en número y tamaño cuando comparaban animales sexualmente maduros e inmaduros, sugiriendo que la SL de alguna manera estaría involucrada en la reproducción. Observaciones preliminares realizadas en el pejerrey, nos llevaron a plantear la hipótesis de que en esta especie también habría un cambio en el tamaño de las células ir-SL relacionado con el estadio reproductivo.

Por otra parte, la proximidad entre las células productoras de SL y la NH podrían indicar un posible control de estas células por neuropéptidos presentes en las

fibras nerviosas (Rand-Weaver *et al.*, 1991b). En base a las observaciones preliminares que indican variaciones de las células SL a lo largo del ciclo reproductivo, se plantea el posible control de GnRH en la regulación de la síntesis y/o liberación de SL.

Capítulo II: ANALISIS DE LAS VARIACIONES DE LAS CÉLULAS PRODUCTORAS DE SL EN LOS DIFERENTES ESTADIOS REPRODUCTIVOS.

II-I Introducción

a) Somatolactina: generalidades

La SL, es una proteína hipofisaria, que fue aislada y caracterizada por primera vez en un pez del orden Gadiformes, el bacalao del Atlántico, *Gadus morhua* (Rand-Weaver *et al.*, 1991a, Takayama *et al.*, 1991a). La SL es una proteína estructuralmente relacionada con GH y PRL, por lo que se la llamó somatolactina, un híbrido entre somatotropina (GH) y prolactina (PRL). Esta glicoproteína en esta especie posee un peso molecular de 26 Kda y 209 aminoácidos, incluyendo ocho residuos de cisteínas (Cys). Posee tres puentes disulfuro entre los residuos Cys⁵-Cys¹⁵, Cys⁶⁵-Cys¹⁸¹ y Cys¹⁹⁸-Cys²⁰⁶. Los residuos de Cys en posición 42 y 180 no están involucrados en la formación de puentes disulfuro. La posición de estos puentes disulfuro es homóloga a la que poseen GH y PRL.

Desde su descubrimiento, la SL ha sido aislada también en representantes de los siguientes ordenes: Salmoniformes: *Onchorhynchus kisutsch* (Rand-Weaver *et al.*, 1992) y *O. Keta* (Takayama *et al.*, 1991b), Perciformes: *Micropogonias undulatus* (Safford, 1992), *Sciaenops ocellatus* (Safford, 1992; Zhu & Thomas, 1995), *Sparus aurata* (Cavari *et al.*, 1995) y *Siganus guttatus*. (Ayson *et al.*, 1999), Pleuronectiformes: *Paralichthys olivaceus* (Ono *et al.*, 1990), *Hippoglossus hippoglossus* (Iraqi *et al.*, 1993) y *Solea senegalensis* (Pendon *et al.*, 1994), Scorpaeniformes: *Cyclopterus lumpus* (Iraqi *et al.*, 1993), Cypriniformes: *Carassius auratus* (Cheng *et al.*, 1997).

Recientemente ha sido clonado el DNA copia (cDNA) de un representante de la subclase Chondrostei, orden Acipenseriformes, el esturión blanco, *Acipenser transmontanus* y de un representante de la clase Sarcopterygii, orden Lepidosireniformes, *Protopterus annectens* (Amemiya *et al.*, 1999). Esto estaría indicando que el gen de SL está presente en dos líneas divergentes, los Actinopterygii (Chondrostei y todos los teleósteos estudiados) y Sarcopterygii.

La SL proviene de una molécula precursora que incluye una secuencia correspondiente al péptido señal. La presencia de un péptido señal es esencial para la secreción y el hecho de que SL se encuentre en la hipófisis, y se libere a la circulación, estaría indicando que es una hormona, de acuerdo a la definición clásica. Del análisis de la secuencia de aminoácidos se desprende que la SL madura y sus precursores consisten en 205-209 aminoácidos y 229-235 respectivamente, dependiendo de las especies consideradas (Kaneko, 1996) (Fig. 10). La SL madura posee un peso molecular que varía entre 24.5 Kda (*O. kisutch*) a 28 Kda (*P. olivaceus* y *S. aurata*). En el curso de su purificación se han identificado variantes más pequeñas en muchas de las especies estudiadas (Rand-Weaver *et al.*, 1991a, Zhu & Thomas, 1995, Cavari *et al.*, 1995), éstas aparentemente serían formas no glicosiladas de la molécula.

La secuencia de SL presenta un 20-30% de homología en su secuencia con GHs, PRLs y lactógeno placentario (PLs) (Rand-Weaver *et al.*, 1993a). Todas estas proteínas podrían derivar de un ancestro común mediante duplicación génica (Cavari *et al.*, 1995).

Esta proteína está altamente conservada, con una homología entre el 75-80 % en géneros poco relacionados filogenéticamente. Entre los más relacionados, como los pleuronéctidos, la homología es mucho mayor. Por ejemplo el cDNA aislado de *H. hippoglossus*, presenta una homología del 95 % con el cDNA de *P. olivaceus* (Ono *et al.*, 1990).

A pesar de la similitud estructural de la SL con GH y PRL, la glicosilación

presente en la SL es una característica única (Kaneko, 1996). Para cada SL el número de sitios potencialmente glicosilables varía entre las diferentes especies. Por ejemplo en *P. olivaceus*, existe un solo sitio de glicosilación (Ono *et al.*, 1990), mientras que en *G. morhua* (Rand-Weaver *et al.*, 1991a, Takayama *et al.*, 1991a) existen dos sitios. Sin embargo, la glicosilación no es una propiedad general de la molécula de SL. Por ejemplo estos sitios están ausentes en la molécula de SL de salmónidos (Rand-Weaver *et al.*, 1991a). Por lo tanto, la SL puede existir en forma glicosilada o no glicosilada. La glicosilación de la SL se refleja en la presencia o ausencia de células reactivas al PAS en la PI. El hecho de que existan dos somatolactinas en una misma especie, una glicosilada y la otra no, plantea interrogantes sobre posibles diferencias funcionales entre los dos tipos de SL (Kaneko, 1996).

Si bien se sabe que la SL es una hormona hipofisaria, existen algunos pocos trabajos que se refieren a la expresión de esta hormona en tejidos extrahipofisarios. Estudios llevados a cabo utilizando la técnica de RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) en diferentes tejidos de trucha arco iris, demostraron que si bien la expresión de SL es predominante en hipófisis, también se expresa en otros tejidos (Yang, *et al.*, 1997). Estudios previos utilizando inmunoblotting de ARN demostraron que la expresión de SL está restringida a la hipófisis en *P. olivaceus* (Ono *et al.*, 1990). Esta discrepancia entre los resultados de los dos autores puede deberse a la metodología utilizada ya que la sensibilidad del método de RT-PCR es mucho mayor que la del inmunoblotting de ARN. Sin embargo es posible que existan diferencias entre especies ya que utilizando técnicas inmunocitoquímicas, Mousa & Mousa (1999a), demostraron la presencia de células ir-SL en el cerebro de *Oreochromis niloticus*.

El hecho de que una hormona hipofisaria se exprese en otros tejidos también fue observado en mamíferos. Por ejemplo GH también se expresa en el sistema inmune (Lytras *et al.*, 1993) o PRL en placenta (Tadokoro *et al.*, 1995), glándulas mamarias

células endócrinas.

Aunque el mecanismo intracelular de la síntesis de SL es poco conocido, se sugiere al factor de transcripción Pit-1, como involucrado en la expresión génica de SL (Ono *et al.*, 1994). Pit-1 es también responsable de la expresión de los genes que codifican para GH, PRL de mamífero y para el desarrollo de las células productoras de PRL y GH. Utilizando un antisuero contra Pit-1 de chum salmon se demostró la presencia de una proteína Pit-1 de 40 kDa en la PI y en la PD de la hipófisis de la trucha arco iris (Ono & Takayama, 1992). Por inmunocitoquímica se demostró la localización de esta proteína en el núcleo de las células productoras de SL en la PI. Por lo tanto es probable que Pit-1 también esté involucrado en la expresión y el desarrollo de las células productoras de SL.

c) Posibles funciones de la SL

El hecho de que la SL presente una estructura tan conservada y esté tan ampliamente presente en teleósteos, sugiere que esta hormona jugaría un rol significativo en la regulación de procesos fisiológicos en este grupo de vertebrados (Johnson *et al.*, 1997).

Se han llevado a cabo numerosos estudios para elucidar la función de esta hormona. Sin embargo, ninguno ha demostrado cuál es su función definitiva. Los resultados obtenidos hasta el momento por los diferentes investigadores son los siguientes:

- Papel de la SL en la regulación del Calcio

Estudios histológicos realizados en varios peces teleósteos (Olivereau *et al.*, 1980, 1981a y b, Olivereau & Olivereau, 1982 a y b, Ball *et al.*, 1982) demostraron que las células PIPAS (células PAS positivas de la PI, presumiblemente células SL) se activaban por exposición de los peces a un medio con baja concentración de calcio.

Más tarde, Kakizawa *et al.*, (1993) trabajando con trucha arco iris demostraron que el área nuclear de las células SL se incrementaba cuando los peces eran transferidos de un medio rico en calcio a uno con baja concentración y esta área volvía a decrecer cuando los peces eran transferidos nuevamente a un medio rico en calcio. Es importante observar que un aumento en el área nuclear estaría indicando una elevada actividad celular (Olivereau *et al.*, 1981b). Los niveles de ARNm de esta hormona determinados por hibridización *in situ*, también disminuyen al transferir los peces a un medio rico en calcio y aumentan cuando nuevamente se los traslada al agua dulce, lo mismo que el área nuclear y los niveles plasmáticos de dicha hormona. La activación de las células productoras de SL en un medio pobre en calcio sugiere una acción hipercalcemiente de SL.

- Papel de la SL en respuesta al stress

Se demostró que diversos factores estresantes del medio ambiente no específicos provocan un aumento en los niveles plasmáticos de SL en salmónidos (Rand-Weaver *et al.*, 1993b, Kakizawa *et al.*, 1995a) y en *Pleuronectes vetulus*, Johnson *et al.*, 1997). Sin embargo, en Sciaénidos no se encontró una relación directa entre el aumento plasmático de SL y el stress (Zhu & Thomas, 1995).

- Papel de la SL en la regulación ácido-base

Una manera de provocar stress es someter a los animales a la realización de ejercicios exhaustivos (Kakizawa *et al.*, 1997). Considerando que la acidosis (disminución del pH sanguíneo), usualmente se da cuando se realizan ejercicios profundos (Heisler, 1993) y posiblemente cuando se dan situaciones de stress, se podría presumir que en realidad el incremento en las concentraciones plasmáticas de SL durante los ejercicios y el stress se produzca por la acidosis asociada. Kakizawa *et al.* (1996), trabajando con trucha arco iris, fueron los primeros en demostrar la relación existente entre el pH sanguíneo y los niveles plasmáticos de SL. Cuando el pH del agua fue disminuido de 7.5 a 4.5 por adición de H_2SO_4 , se produjo una acidosis considerable. El pH sanguíneo decreció de 7.6 a 7.1, 4 días después de la exposición de los peces al medio ácido, mientras que los niveles plasmáticos de SL se incrementaron un día después de la acidificación del agua. Por otro lado, cuando se induce a los peces a la realización de ejercicios exhaustivos por 8 minutos, y luego se los transfiere a peceras de descanso, se observa un aumento en los niveles plasmáticos de SL inmediatamente después del ejercicio, justamente cuando la acidosis es mayor. Los niveles de SL en plasma tienden a disminuir conjuntamente con la disminución de la acidosis.

- Papel de la SL en el metabolismo de las grasas

Es prácticamente imposible realizar la remoción de las células somatolactínicas sin afectar otros tipos celulares. Por lo tanto, las técnicas de estudio que incluyen la extirpación de cierto tejido endócrino y el posterior análisis de los efectos causados no es posible en este caso. Sin embargo, existe una variedad de trucha arco iris de coloración azulada, llamadas “cobalto” en la cual se ha demostrado que carece de la PI

de la hipófisis (Kaneko *et al.*, 1993b). Como mencionáramos anteriormente, ya que las células productoras de SL se encuentran en la PI, esta variedad de trucha podría servir como modelo para el estudio de la SL. Esta patología se caracteriza no sólo por carecer de PI, sino también porque la hipófisis malformada está completamente separada del hipotálamo. Los estudios histológicos han demostrado que las células productoras de GH y PRL son las predominantes, mientras que existen unas pocas células SL y MSH. Por otra parte los niveles plasmáticos de SL son extremadamente bajos, y si bien los niveles de GH son bajos están dentro de un rango fisiológico. Los niveles de PRL son iguales que en peces normales.

La diferencia fundamental entre la truchas arco iris normal y la variedad “cobalto” es la deposición de la grasa en la cavidad abdominal (1.6 % en peces normales versus 12 % en el “cobalto”). Ya que la anomalía en el color se le podría atribuir a la poca cantidad de células MSH (Oguri, 1983), la anomalía en el metabolismo de las grasas podría deberse a la casi ausencia de SL.

- Papel de la SL en la adaptación a su medio ambiente (background)

Los primeros estudios indicaban que las células PIPAS se activaban durante la adaptación a un background (entorno) oscuro en *Sarotherodon mossambicus* (Van Eys, 1980) y en *Poecilia latipinna* (Ball & Batten, 1981). Sin embargo, como mencionamos anteriormente, en salmónidos las células productoras de SL son cromofóbicas, y en este caso no son activadas por adaptación a un background oscuro.

Estudios recientes indican que en *Sciaenops ocellatus* y en *Micropogonias undulatus* los niveles de SL en plasma eran mucho mayores en los animales mantenidos con un background oscuro que aquellos con un background claro (Zhu & Thomas, 1995, 1996). En la trucha arco iris no se observan cambios en los niveles plasmáticos de

SL cuando se los adapta a los diferentes background (Kakizawa *et al.*, 1995a). Estos datos sugerirían que la SL cumpliría un rol en la adaptación a un background oscuro en no salmónidos, pero no en salmónidos.

-Papel de la somatolactina en la reabsorción de fósforo en el túbulo proximal renal.

Lu *et al.*, (1995) demostraron que la SL de salmón estimula la reabsorción de fósforo inorgánico (Pi) de manera dosis dependiente a los niveles fisiológicos de la hormona, en cultivos primarios de células del túbulo proximal renal de *Pleuronectes americanus*. El transporte de Pi fue significativamente alterado cuando los cultivos eran expuestos a la presencia de SL de salmon, sin embargo, las fluctuaciones de Ca²⁺ no sufrieron variaciones. El tratamiento de estas células con SL de salmón produce un aumento de AMPc y además la reabsorción de Pi es inhibida por el agregado de H89 un inhibidor de la Proteína Kinasa A. Estos resultados indicarían que la acción de SL estaría mediada por el sistema de transducción de señales vía Proteína Kinasa A (PKA) en *Pleuronectes americanus*.

-Papel de la somatolactina en la reproducción.

Los primeros trabajos que sugieren una función para la SL en la reproducción fueron los realizados por Rand-Weaver *et al.*, (1992), quienes desarrollaron un radioinmunoensayo (RIA) específico para la SL del coho salmon, y midieron los niveles plasmáticos en este pez, durante el último año reproductivo (la mayoría de los coho salmon desovan a los 3 años de edad, luego de lo cual mueren). Durante el periodo de crecimiento gonadal, los niveles plasmáticos de SL se incrementaron. Este aumento se correlaciona con el aumento de los niveles de estradiol en hembras y 11-

cetotestosterona en machos. Los niveles plasmáticos más altos se observaron durante la maduración final y el desove/espermiación en ambos sexos.

Por otro lado, los niveles en plasma de SL también en este mismo pez se elevaron durante la maduración sexual y la “smoltificación”. En condiciones naturales el coho salmon es anádromo, es decir migra en primavera como juvenil (1 año de vida) del agua dulce al mar, donde permanece por lo menos un año. Previo a las migración sufre importantes cambios morfológicos, fisiológicos y comportamentales que le permiten sobrevivir en ese nuevo ambiente. Este proceso se denomina “smoltificación”. Durante el otoño del segundo año en el agua de mar, vuelve a migrar al agua dulce. Durante la “smoltificación”, los niveles de SL variaron casi en paralelo con los niveles plasmáticos de tiroxina. Cuando la smoltificación esta finalizando los niveles de ambas hormonas comienzan a decrecer. Los niveles plasmáticos de SL permanecen bajos luego de este período y comienzan a incrementarse durante la maduración gonadal, alcanzando un pico durante el desove, mayor que el registrado durante la “smoltificación” (Rand-Weaver & Swanson, 1993). Por otra parte, también en coho salmon, SL estimula la producción de 11-cetotestosterona y testosterona *in vitro* en fragmentos de testículo, y la producción de estradiol de folículos ováricos de manera dosis dependiente (Planas *et al.*, 1992). Sin embargo, la actividad esteroideogénica es menor a la producida por GtH I.

En contraste con estos resultados, Kakizawa *et al.*, (1995b), no observaron una clara correlación entre los niveles plasmáticos de SL y la maduración gonadal final en el chum salmon. Se capturaron peces del mar, de la bahía y del río durante la migración corriente arriba. Se observó un incremento en los niveles de SL en los peces capturados en el río, pero esto no parecía estar correlacionado con el desarrollo gonadal. Por otra parte, en *Micropogonias undulatus* tampoco se observó un incremento en los niveles de SL durante el desarrollo gonadal (Zhu & Thomas, 1997).

Experimentos de castración en *Salmo salar*, maduros, mostraron una reducción en los niveles plasmáticos e hipofisarios de SL comparados con animales controles (Mayer *et al.*, 1998), sugiriendo que los testículos maduros tendrían un efecto estimulador en la síntesis y liberación de SL. Sin embargo, tratamientos a los animales castrados con testosterona, 11-cetotestosterona o $17\alpha, 20\beta$ -hidroxi-4-pregnen-3-ona (20-P) no lograron abolir los efectos de la castración.

Por otro lado, los estudios histológicos proveen evidencias que apoyarían el rol de la SL en la reproducción. En dos especies de, *Oncorhynchus nerka* y *O. keta*, utilizando técnicas inmunocitoquímicas, se demostró un incremento tanto en número como en tamaño, de las células productoras de SL en animales inmaduros con respecto a los maduros. Las células ir-SL en peces inmaduros, aparecían menores y menos inmunoreactivas que las células ir-SL de los peces maduros. En peces próximos a desovar, estas células eran mucho grandes y presentaban frecuentemente mayor cantidad de gránulos. Células grandes con mayor o menor degranulación, indicarían una activa liberación de gránulos de SL (Olivereau & Rand-Weaver, 1994a). En *Oncorhynchus tshawytscha*, los mismos autores, también observaron cambios morfológicos en las células somatolactínicas en relación con el desarrollo gonadal (Olivereau & Rand-Weaver, 1994b). Recientemente, Mousa & Mousa (1999a) observaron variaciones estacionales en número, tamaño e intensidad de la marcación en las células productoras de SL, en concordancia con el desarrollo gonadal y el desove en *Oreochromis niloticus*.

Todos estos resultados estarían involucrando de algún modo a la SL en la reproducción, pero ninguno de ellos provee una evidencia directa. Como se sabe la reproducción incluye no sólo el desarrollo gonadal y el desove, sino también varios eventos biológicos asociados, tales como la energía metabólica, la alimentación y la ionoregulación (Kakizawa *et al.*, 1995b).

En base a lo planteado en esta introducción, se ha propuesto analizar las variaciones de las células productoras de SL en pejerreyes en diferentes estados de maduración gonadal, recalcando que el pejerrey, a diferencia de los Salmónidos transcurre todo su ciclo de vida en el mismo ambiente.

Se plantean como objetivo de este segundo capítulo lo siguiente:

II-II Objetivos

- **Caracterizar inmunológicamente a la SL de pejerrey, y determinar la especificidad de los antisueros utilizados.**

- **Analizar las variaciones de las células productoras de SL en relación con los diferentes estadios reproductivos.**

II-III Materiales y métodos

a) Caracterización inmunológica de la somatolactina de la hipófisis de pejerrey por Western blot

El hecho de estar trabajando con un sistema de antisueros heterólogos, obliga a determinar la especificidad de los mismos. Si bien en el capítulo I se determinó que cualquiera de los antisueros contra SL reconocían las mismas células, los controles se reforzaron realizando una caracterización inmunológica de la SL utilizando la técnica de Western blot.

SDS-PAGE

La determinación del peso molecular (PM) de la SL y la especificidad de los antisueros contra SL utilizados en las técnicas de inmunocitoquímica se realizó por Western blot. Se utilizaron 20 hipófisis (45 mg) provenientes de pejerreyes adultos de la laguna de Chascomús, las cuales fueron homogeneizadas con un homogeneizador vidrio-teflón en 2 ml. de buffer Tris-HCL 50 mM, pH 7.4. El homogenato fue luego centrifugado a 6000g por 30 min. Una alícuota del sobrenadante se utilizó para determinar la concentración de proteínas (Lowry *et al.*, 1951) y el resto se guardó a -20°C hasta el momento de la electroforesis SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis patterns). Se tomaron 5 µl del homogenato (37 µg de proteínas) junto con 5 µl de buffer de siembra [120 mM TRIS-HCL pH 6.8, 3% dodecil sulfato de sodio (SDS), 10% glicerol y 0.2% azul de bromofenol] en condiciones reductoras (1% β-mercapto etanol) y no reductoras. Cuando los homogenatos se corrieron en una solución sin β mercapto etanol, no se logró obtener bandas bien definidas, sin embargo las muestras con β mercapto etanol definieron bien las bandas. Se calentaron a 95°C por 5 min luego del cual se centrifugaron a 10000g por 1 min. Las muestras se sembraron en un gel acrilamida-bis acrilamida (15%-0.4%) en buffer Tris HCL 350 mM, pH 8.8. En una de las calles se sembró SL recombinante de *Sparus aurata* en las mismas condiciones que el homogenato. Para determinar el PM relativo (Mr) se sembró además una mezcla compuesta por: fosforilasa b, (97.4 kD), sero albúmina (66.2 kD), ovoalbúmina (45 kD), anhidrasa carbónica (31 kD), inhibidor de tripsina (21.5) y lisosima (14.4 kD). El procedimiento fue llevado a cabo mediante un sistema de electroforesis vertical (Mini-PROTEAN II, BIO-RAD), utilizando geles de 1.75 mm de espesor, preparados entre placas de vidrio (8 x 7.3 cm), empleando un gel separador (4 ml) y un gel stacking, acrilamida-bis acrilamida (2.5%-0.06%) en buffer Tris HCL 124 mM, pH 8.8. Cada gel

constaba de 10 calles. En 4 de las calles se sembraron 10 cada calle se sembraron

La separación de las proteínas se realizó a un voltaje de 100V hasta que las muestras llegaron al gel stacking luego de la cual el voltaje se cambió a 150 V (tiempo aproximado 2 hs).

Transferencia

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE fueron posteriormente transferidas en buffer de transferencia (Tris 0.025M, glicina 0.187 M, 20% metanol) a membranas de nitrocelulosa (BRL Hybri-dot Manifold, Life Technologies, Inc.) por aplicación de un amperaje constante de 300 mA durante una hora.

Una vez concluida la transferencia, el gel y la membrana de nitrocelulosa fueron separadas. El gel fue coloreado con una solución de Coomassie blue (0.1% Coomassie Brilliant Blue, 50 % de metanol, 10 % de ácido acético) por 2 hs y luego lavado con solución decolorante (5% ácido acético, 7.5% de metanol) con el objeto de verificar la eficiencia de la corrida electroforética y la distribución de los estándares de PM. Por otra parte, con el objeto de verificar la eficiencia de la transferencia e identificar las distintas calles, la membrana de nitrocelulosa fue tratada durante 2 min, a temperatura ambiente y con agitación constante, con una solución Ponceau S (ácido 3-hidroxi-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenilazo)fenilazo]-2,7-naftalenodisulfónico). Esta solución se preparó a partir de 1 parte de una solución stock (2% Ponceau S en 30% ácido tricloroacético) en 9 partes de una solución 1% de ácido acético. Posteriormente se decoloró totalmente la membrana mediante un excesivo lavado con agua bidestilada.

Las condiciones reductoras fueron eficientes para la determinación del PM de la SL, con lo cual se utilizó este tratamiento para los análisis posteriores. Para la determinación del PM de esta hormona se comparó la distancia relativa de la banda

correspondiente con las distancias relativas de una mezcla de proteínas de PM bajo. Se caracterizó cada banda por su valor de relación de frentes (R_f) correspondiente, siendo:

$$R_f = \frac{\text{Distancia (cm) recorrida por la proteína considerada}}{\text{Distancia (cm) recorrida por el azul de bromofenol.}}$$

Conociendo el valor de M_r de cada proteína patrón se construyó el gráfico (R_f vs. $\log M_r$ correspondiente).

Western blot

Las membranas de nitrocelulosa fueron mantenidas en una solución de TTBS (100 mM Tris, 0.9 % ClNa, Tween 20 0.1%, pH: 7.5) hasta que se realizó el bloqueo (150 μ l de suero de caballo en 10 ml de TTBS). Esta incubación fue realizada con el propósito de evitar la adsorción inespecífica. Luego de dos lavados en TTBS, las membranas fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente en el antisuero primario preparado en conejo (anti-saSL, anti-coho salmon SL, anti-chum salmon SL y anti-rdSL, ver Tabla 1, cap. I, 1:2500) en TTBS. Una vez transcurrido este tiempo las membranas se lavaron nuevamente en TTBS dos veces 10 min cada vez. Luego se sometió a las membranas por 30 min al anticuerpo secundario unido a biotina (Vector Lab., Burlingame, CA), se lavaron nuevamente en TTBS y se pusieron en contacto con el complejo avidina-biotina peroxidasa (Vector Lab., Burlingame, CA) por 30 min. Una vez transcurrido este tiempo, las membranas fueron reveladas en una solución 0.03% 3,3' diaminobencidina en Tris buffer (pH: 7.6) y 0.02% de H_2O_2 y otras con un kit comercial quimioluminiscente (Western blot Chemiluminescence Reagent, Nen Life Science Products, Boston, MA).

b) Relación entre el volumen de las células productoras de SL y el estado reproductivo

Animales

Hembras (n:29) y machos (n:15) fueron coleccionados a lo largo de un año de estanques externos en la Estación experimental de la Saitama Prefecture Fisheries (Japón). Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Carlos Strusmann, quien determinó el estadio reproductivo de cada animal (por análisis histológico de las gónadas) y el índice gonadosomático (GSI%) (peso de las gónadas/peso corporal). Las gónadas y los cerebros junto con las hipófisis fueron removidos y fijados en Bouin. Luego de la inclusión en parafina, las gónadas fueron cortadas y se realizó un análisis histológico de las mismas. El estadio reproductivo en hembras fue determinado midiendo el GSI% y realizando un análisis de los ovarios. De acuerdo a esto fueron clasificadas en activas (vitelogénicas o predesove) o inactivas (en reposo o regresadas). Los machos fueron clasificados de acuerdo al GSI%. Los cerebros junto con las hipófisis también fueron incluidos en parafina y de cada uno se realizaron cortes seriados parasagittales de 7 μm , los cuales fueron montados en portaobjetos previamente gelatinizados.

Inmunohistoquímica

Cada corte fue inmunomarcado, utilizando el método ABC, descrito previamente en el capítulo I. Las secciones fueron desparafinadas en xileno, hidratadas en una serie decreciente de alcoholes y llevados a PBS. Las secciones se incubaron por 30 min en 0.3% de agua oxigenada para bloquear las peroxidasas endógenas y fueron

lavadas luego en PBS. Para reducir las marcaciones no específicas los cortes fueron tratados con suero normal de caballo por 30 min y lavados luego en PBS. El antisuero primario, anti-chum salmon SL (1:1000) fue aplicado a los cortes y estos se incubaron toda la noche a 4°C. El antisuero secundario biotinilado, anti-conejo IgG y el complejo ABC fue aplicado durante una hora cada uno. El producto final se visualizó con 0.3% 3,3'-diaminobenzidina en buffer Tris HCL, pH 7.6 y 0.02% H₂O₂. Las secciones fueron montadas en DPX.

En alguno de los cortes se realizó la reacción de PAS (Acido peryódico de Schiff) para determinar si las células productoras de SL eran PAS positivas.

Determinación de las medidas de las células productoras de SL

De los cortes inmunomarcados, fueron seleccionadas 64 células ir-SL de diferentes zonas de la hipófisis para ser medidas con el analizador de imágenes (Quantimet 520 Leica). Se seleccionaron sólo aquellas células en la que se notaba claramente la forma elongada típica de las células productoras de SL, es decir las que en el corte aparecen claramente sagitales. Se descartaron todas las células que presentaron una forma redondeada, para evitar medir las cortadas en un plano transversal.

A cada célula se le midió el área celular y el área nuclear. También se determinaron otros parámetros como el perímetro, largo mayor y ancho mayor tanto de la célula como del núcleo.

Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de un factor, y análisis de correlación.

Análisis estadístico

Los valores se expresan como la media \pm la media de los desvíos estándar (SEM). Los datos fueron analizados utilizando un programa para el análisis de datos estadístico (GraphPad InStat). Para comprobar si el área celular y el GSI% o el área celular y el área nuclear varían juntas se realizó una correlación de Pearson. Las diferencias entre la media del área celular de las células ir-SL en peces con diferentes status reproductivo, se realizó un Test de Student (Estadístico de “t” para dos muestras independientes). Las diferencias fueron consideradas significativas a $P < 0.05$ o $P < 0.01$.

II-IV Resultados

a) Caracterización inmunológica de la somatolactina de la hipófisis de pejerrey por Western blot

Por medio de la técnica de Western blot se reveló una banda principal de aproximadamente 33 kD con todos los antisueros utilizados (Fig. 11 y 12). Sin embargo, otras bandas de menor peso molecular también se revelaron aunque con menor intensidad. Las bandas de PM mayor que 33 kD corresponderían a dímeros de SL.

Por otra parte, cuando se utilizó la técnica de PAS en cortes seriados de hipófisis se demostró que las células productoras de SL son PAS positivas indicando que esta proteína se encuentra glicosilada (Fig. 13).

b) Relación entre las células productoras de SL y el estadio reproductivo

En todos los individuos estudiados, las células ir-SL fueron detectadas en la PI. No se encontraron células inmunomarcadas en la PDR ni en la PDP, indicando que no hay reacción cruzada con GH y PRL. Las células ir-SL eran elongadas y mostraron una polaridad típica, con el núcleo localizado en la parte apical y los gránulos concentrados en la parte basal de la célula. Las células somatolactínicas son de mayor tamaño y con mayor cantidad de gránulos en las hembras comparadas con machos.

Hembras

En la hipófisis de las hembras inactivas (no vitelogénicas), las células ir-SL fueron más pequeñas y suavemente granuladas comparadas con la de las hembras activas (vitelogénicas) (Fig. 14) y el análisis estereométrico mostró diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) en el área celular ($62.9 \pm 2.1 \mu\text{m}$, $76.8 \pm 2.3 \mu\text{m}$) (Fig. 15). Aunque no fueron cuantificadas, el número de células ir-SL parece ser mayor en hembras sexualmente activas.

Las áreas celular y nuclear se correlacionaron positivamente ($r: 0.43$; $P < 0.05$) (Fig. 16). Por su parte, el área celular y el GSI% también se correlacionaron positivamente ($r: 0.49$; $P < 0.01$) (Fig. 17).

Machos

Las células ir-SL de la hipófisis de los machos con GSI% bajos fueron más pequeñas y suavemente granuladas (Fig. 18). En machos con altos valores de GSI%, aunque no se cuantificó, el número de células ir-SL parece mayor y el área

inmunomarcada se encuentra incrementada comparada con los machos con menor GSI%. Sin embargo, aunque se observó una tendencia a aumentar el área de las células ir-SL con el GSI%, esta correlación no fue estadísticamente significativa (Fig. 19). En ambos casos, el área celular no se correlacionó con el área nuclear (Fig. 20).

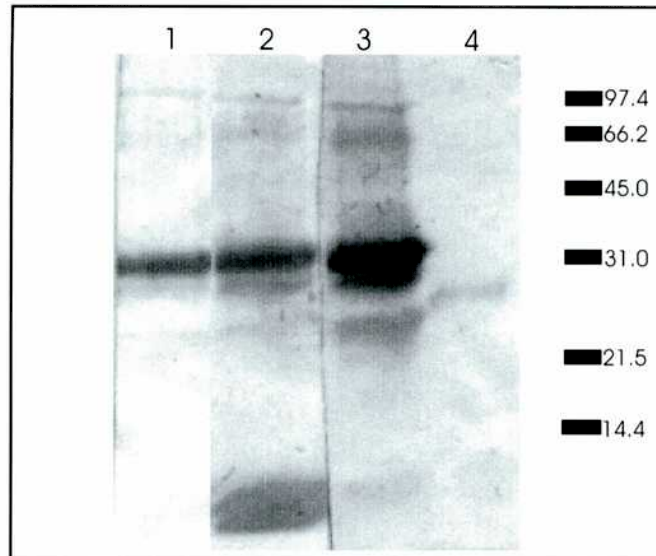


Fig. 11: Reconocimiento de SL mediante el análisis por Western blot. En los carriles 1 a 3, homogenatos de hipófisis de pejerrey fueron sometidos a una electroforesis en geles de poliacrilamida (15%) en presencia de SDS y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Luego fueron incubados con anti-rdSL (carril 1), anti-coho salmon SL (carril 2), anti-saSL (carril 3). En el carril 4 se sembró SL recombinante de *Sparus aurata* y se reveló con su antisuero. Las muestras se trataron bajo condiciones reductoras. A la derecha se indican la movilidad de los estándares de PM.



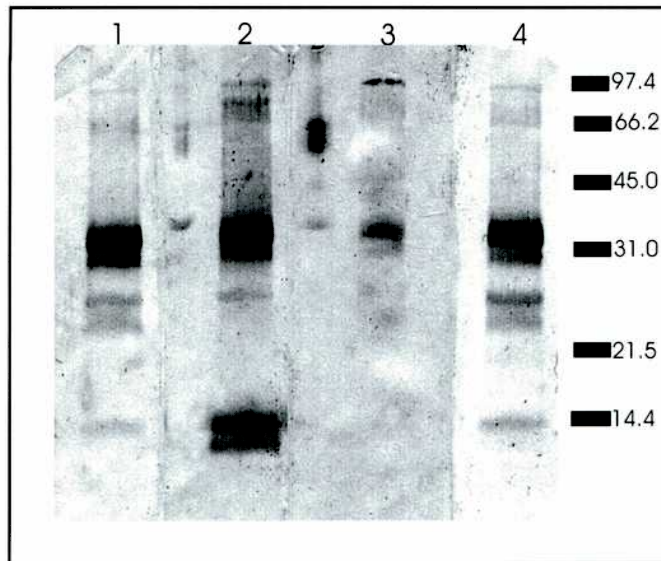


Fig. 12: Reconocimiento de SL utilizando diferentes antisueros: anti-saSL (carril 1), anti-coho salmon SL (carril 2), anti-rdSL (carril 3) y anti-chum salmon SL.. Las muestras se trataron bajo condiciones reductoras. A la derecha se indican la movilidad de los standares de PM.

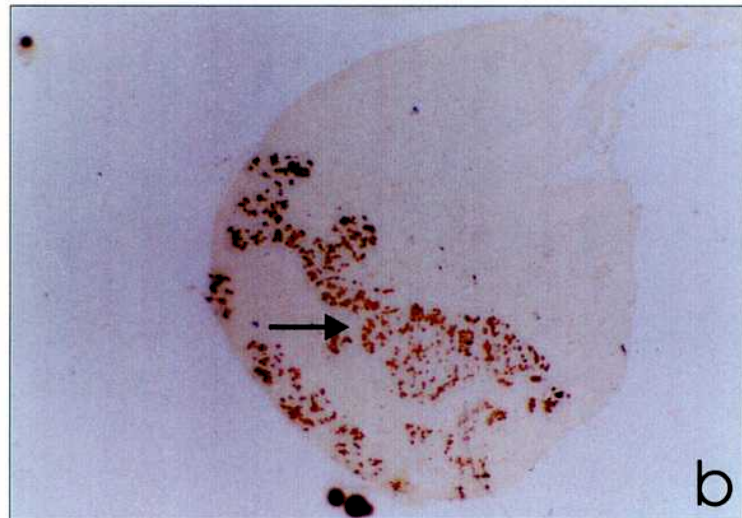
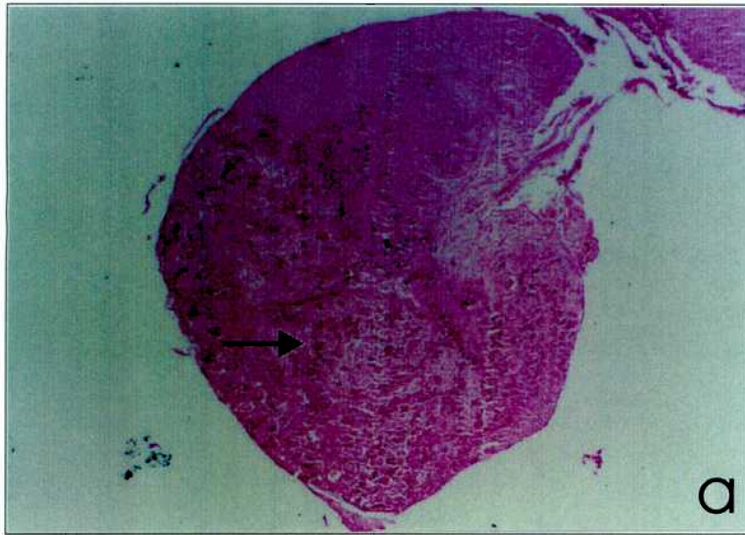


Fig. 13: Dos cortes sucesivos de hipofisis de pejerrey, en donde se observan las mismas células coloreadas con la técnica de PAS (a) y con anti-saSL (b) (flecha). Esto estaría indicando que las células ir-SL son PAS positivas, x100.

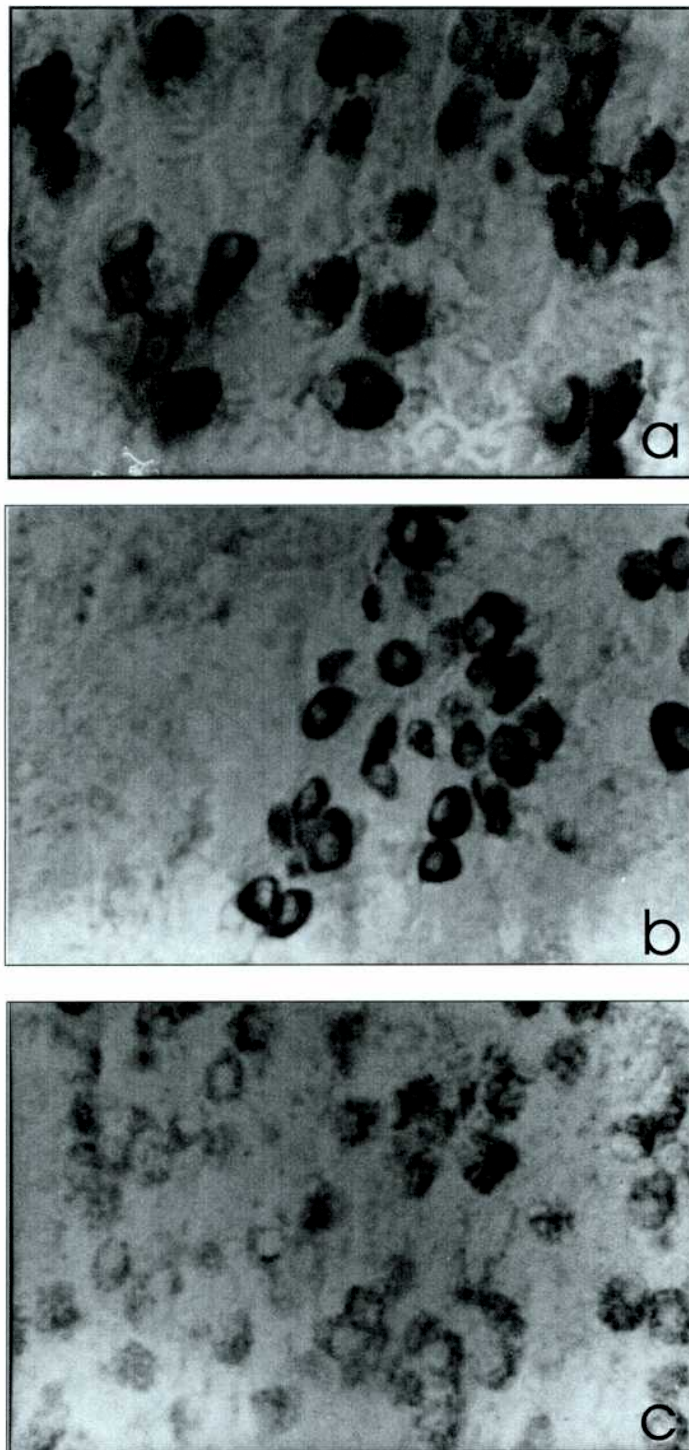


Fig. 14 : Cortes parasagitales de hipófisis de pejerrey hembra, en donde se observa el aspecto de las células ir-SL. (a) GSI 11.9% (b) GSI 2.91% y (c) GSI 1.79%. A medida que disminuye el GSI% las gónadas son más inmaduras. Nótese la diferencia de tamaño de las células en los diferentes cortes. x 500.

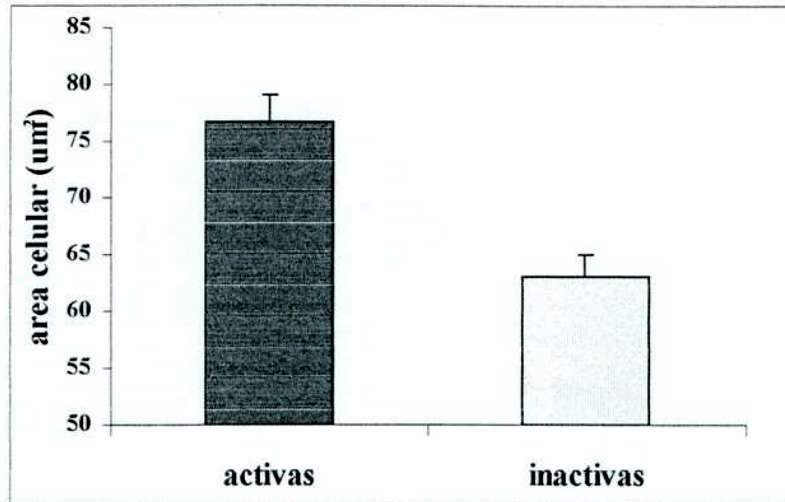


Fig. 15: Comparación entre el área celular de las células ir-SL en hembras activas o vitelogénicas e inactivas o no vitelogénicas. Los valores representan la media \pm el error standart de la media (76.8 \pm 2.3 μ m, 62.9 \pm 2.1 μ m). Las diferencias son significativas (P<0.01).

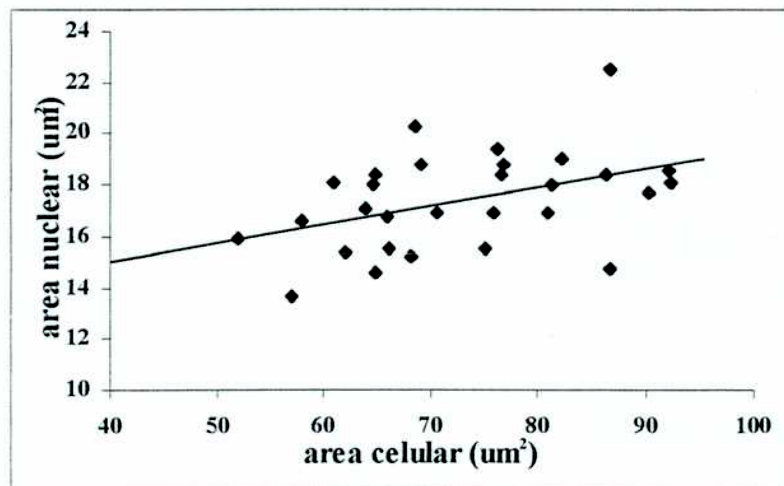


Fig. 16: Correlación entre el área nuclear y el área celular de las células ir-SL de la hipófisis de hembras de pejerrey (r:0.43; P<0.05).

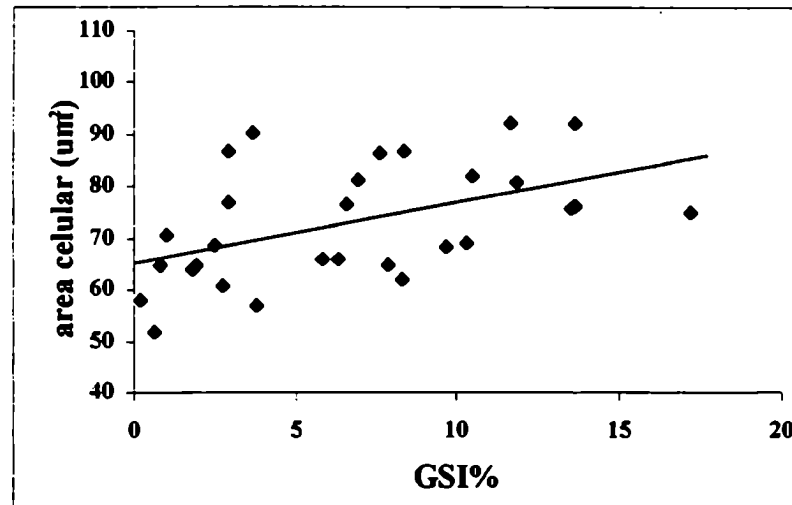


Fig. 17: Relación entre el área de las células ir-SL y el GSI% en hembras. Cada punto representa la media de 64 células. El área celular se incrementa significativamente concomitante con el GSI% ($r:0.49$, $P<0.01$).

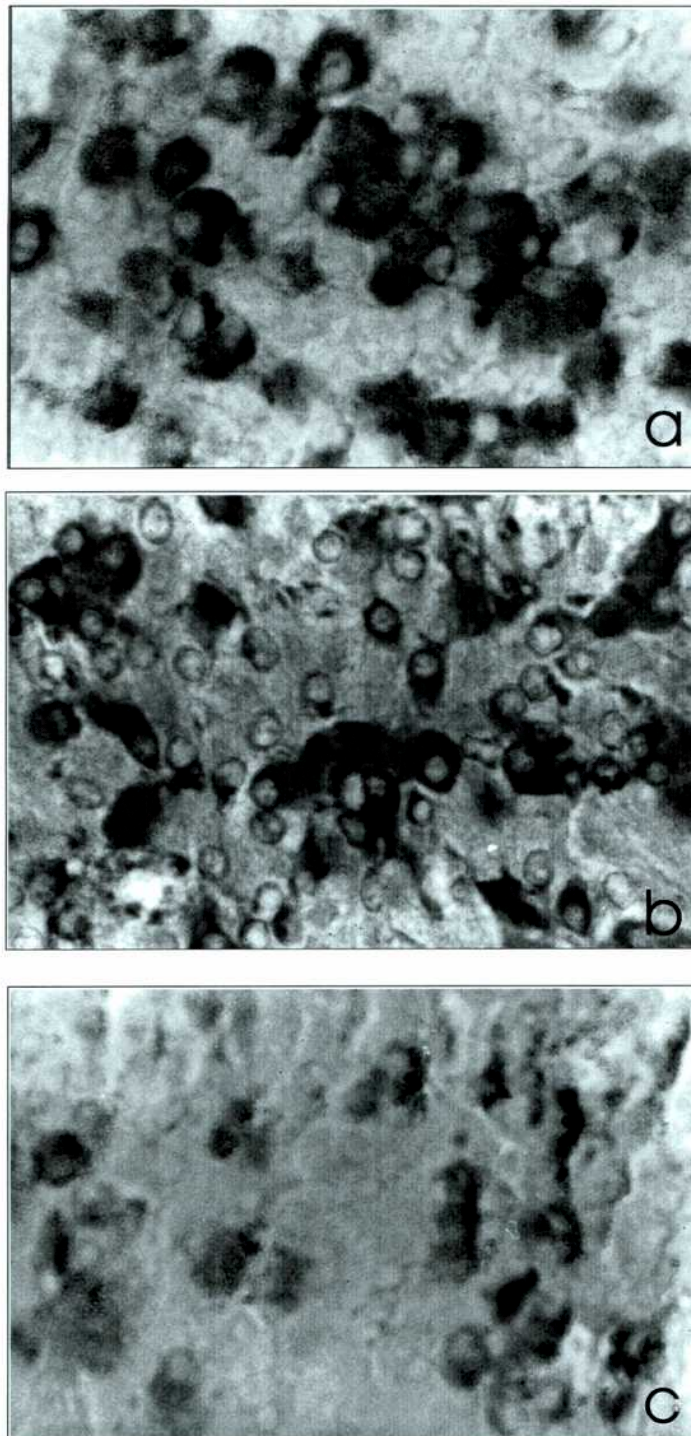


Fig. 18 : Cortes parasagitales de hipófisis de pejerrey macho, en donde se observa el aspecto de las células ir-SL. (a) GSI 2.98%, (b) GSI 1.72% y (c) GSI 0.34%. Nótese la diferencia de tamaño de las células en los diferentes cortes. En la fig. c) las células presentan un citoplasma reducido y se observa una degranulación importante en el citoplasma, x 500.

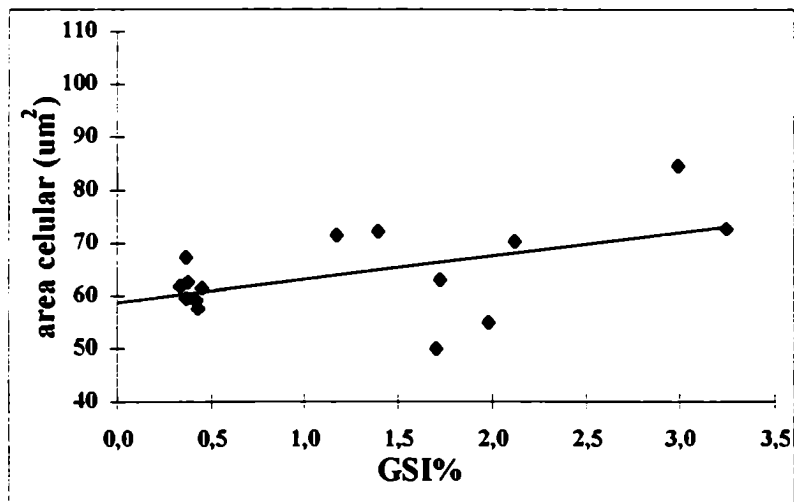


Fig. 19.: Relación entre el área celular y el GSI% en machos. Cada punto representa la media de 64 células medidas. Aunque se observa una tendencia positiva, la correlación no es positiva ($r:0.51$).

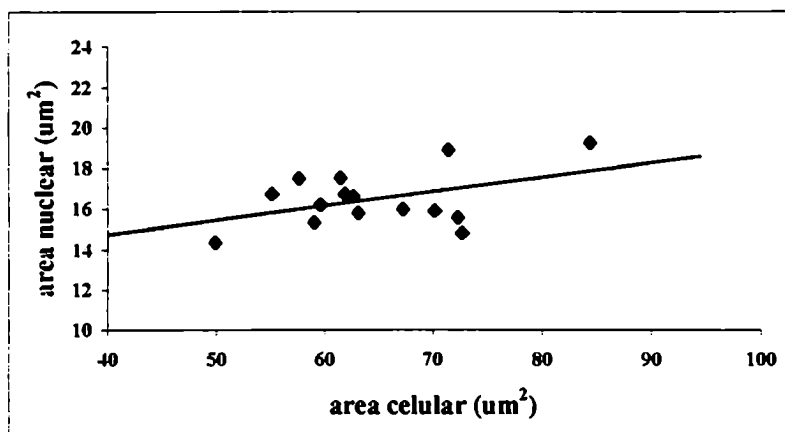


Fig. 20: Correlación entre el área nuclear y el área celular en machos. La correlación no es positiva ($r:0.44$).

II-V Discusión

El análisis por Western blot confirmó lo observado por inmunocitoquímica, todos los antisueros utilizados para poner en evidencia a las células productoras de SL la reconocieron específicamente.

La banda predominante de aproximadamente 33 kD estaría indicando que esta hormona en el pejerrey se encuentra altamente glicosilada, y probablemente en mayor grado que en otras especies. Cabe aclarar que la movilidad electroforética sirve para estimar el PM de una proteína y en la mayoría de los casos no coincide con el PM real calculado con otros métodos más exactos, tales como la secuenciación de aminoácidos. Dado que usando el mismo sistema de separación electroforética, el PM de la SL recombinante de *Sparus aurata* fue estimado en 27 kD, mientras que el PM real deducido por secuencia de aminoácidos fue de 24 kD (Astola *et al.*, 1996) no se puede descartar que para la SL de pejerrey se este sobrestimando su PM en uno a tres kD.

Las señales inmunoreactivas a SL de menor PM, probablemente estén indicando la expresión de formas de SL en estado no glicosilado. La presencia de dos formas de SL en diferente estado de glicosilación se observó en diferentes especies de teleósteos (Astola *et al.*, 1996, Johnson *et al.*, 1997) y probablemente es lo que suceda en el pejerrey. Al respecto, es importante destacar que un análisis preliminar de la expresión de SL a lo largo de la ontogenia del pejerrey demostró que el antisuero contra SL de red drum (en este caso SL glicosilada) reconoció células ir-SL en juveniles de más de 50 días post eclosión y no antes. Sin embargo, el anticuerpo contra chum salmon SL (SL no glicosilada) fue efectivo en marcar células ir-SL al día 1 post eclosión (resultados no mostrados). Si bien no sabemos cuál es el epítopo que reconoce cada antisuero utilizado, desde que ambos antisueros son efectivos para inmunomarcas SL en adultos, se puede suponer la expresión de diferentes SL, una presente desde etapas tempranas del

desarrollo y otra que se expresaría en etapas posteriores. Para validar esta hipótesis se requieren análisis más profundos los cuales se llevarán a cabo posteriormente a esta Tesis Doctoral.

Por otra parte cuando se realizó la tinción de PAS ésta demostró que las células productoras de SL son positivas a este colorante, indicando la presencia de SL en estado glicosilado.

Las células ir-SL en el pejerrey presentaron en ambos sexos importantes cambios relacionados con el estadio reproductivo. En peces maduros, las células ir-SL aparecieron de mayor tamaño comparadas con las de aquellos peces con gónadas en regresión. Sin embargo, en machos la correlación entre el área de las células ir-SL y el GSI% no fue estadísticamente significativa. Estos resultados concuerdan con estudios realizados en dos especies del género *Oncorhynchus* (Olivereau & Rand-Weaver, 1994a,b). Recientemente, ha sido reportado un incremento en el número y la actividad de células ir-SL (caracterizadas por hipertrofia, vacuolización e intensidad de la inmunomarcación) en relación con el aumento de la actividad gonadal en *Oncorhynchus niloticus* (Mousa & Mousa, 1999a). Además el estudio de ejemplares de la misma especie provenientes de un lago con altos niveles de contaminación, demostró una declinación en la actividad gonadal de ejemplares adultos junto con una disminución de la actividad secretora de las células ir-SL (Mousa & Mousa, 1999b).

La relación entre SL y actividad gonadal puesta de manifiesto mediante análisis morfológico ha sido también correlacionada mediante el estudio de los niveles hormonales en sangre. En efecto, en el coho salmon, *O. kisutch* se observó una elevación de los niveles plasmáticos de SL durante la maduración final (Rand-Weaver *et al.*, 1992; Rand-Weaver & Swanson, 1993) que fue también correlacionado positivamente con los niveles plasmáticos de esteroides (Rand-Weaver *et al.*, 1992). En esta especie,

SL también estimula la esteroidogénesis gonadal *in vitro* (Planas *et al.*, 1992). En otra especie del género *Oncorhynchus*, el chum salmon *O. keta*, Taniyama *et al.* (1999) sugirieron que la expresión del gen de SL es elevada durante la maduración sexual. En *Salmo salar*, la gonadectomía reduce significativamente los niveles plasmáticos de SL y los niveles hipofisarios (Mayer *et al.*, 1998), pero los tratamientos de restitución con esteroides no lograron restituir los niveles plasmáticos de SL a los niveles controles. Estos datos estarían indicando una relación entre la síntesis y secreción de SL y la maduración sexual pero aparentemente por una vía alternativa que no involucra a los esteroides gonadales (Mayer *et al.*, 1998).

Otros resultados, en cambio, no han logrado evidenciar esta relación y han sugerido que el incremento en los niveles de SL correlacionados con el desarrollo gonadal en salmónidos estaría más relacionado con factores estacionales que con el desarrollo gonadal en sí mismo (Rand-Weaver *et al.*, 1995). Kakizawa *et al.* (1995b), no encontraron una clara correlación entre los niveles plasmáticos de SL y la maduración gonadal en *O. keta*. Mas aún, no se encontraron cambios en los niveles plasmáticos de SL en dos especies de Scienidos, *Sciaenops ocellatus* y *Micropogonias undulatus* (Zhu & Thomas, 1995).

Los resultados obtenidos y resumidos en este capítulo, aportan una fuerte evidencia de que SL podría estar involucrada en la reproducción, aunque no podemos descartar el papel de la temperatura, el fotoperíodo y otros cambios estacionales que se producen conforme avanza el desarrollo gonadal. Es importante hacer notar que al menos en la trucha arco iris la temperatura del agua se correlacionó positivamente con los niveles plasmáticos de SL (Rand-Weaver *et al.*, 1995) y que en el pejerrey la temperatura está relacionada con distintas etapas del proceso reproductivo (Strüssmann, 1989). Sin embargo, desde que tanto hembras como machos fueron sometidos a condiciones similares de cautiverio y que sólo en las primeras se pudo verificar una

correlación significativa entre GSI% y área celular de las células SL, no podemos desechar la hipótesis de que SL esté implicada, directa o indirectamente, en los procesos reproductivos de hembras de pejerrey.

Como mencionáramos anteriormente, las células ir-SL se localizan en la PI en proximidad a la NH. El hecho de que se observen variaciones en el área de las células ir-SL en relación con el estadio reproductivo y la asociación que estas células tienen con la NH, de alguna manera estaría indicando que algún factor o factores hipotalámicos intervendrían en la síntesis y liberación de SL. Dado que GnRH es el neuropéptido que fundamentalmente interviene en los procesos reproductivos regulando la actividad de las gonadotrofinas, podría estar regulando también a SL. Es por esto que se plantearon los experimentos del próximo capítulo, tendientes a ver si existe una relación entre GnRH y las células productoras de SL.

CAPITULO III: RELACIÓN DEL NEUROPEPTIDO LIBERADOR DE GONADOTROFINAS (GnRH) Y LAS CÉLULAS PRODUCTORAS DE SL

III-I Introducción

En todos los vertebrados, el neuropéptido GnRH cumple un rol fundamental no sólo en el desarrollo y el mantenimiento de la función reproductiva, estimulando la síntesis y liberación de las gonadotrofinas (GtH I y GtH II) hipofisarias sino también en los cambios comportamentales relacionados con la reproducción. Este neuropéptido se sintetiza en determinadas áreas cerebrales alcanzando la hipófisis directamente (teleosteos) o a través del sistema porta-hipofisario (tetrápodos).

Hasta el momento se han identificado catorce variantes de GnRH (Tabla 2), doce en vertebrados y dos en protocordados. El nombre de cada una de estas variantes proviene de la especie en la que fue descrita por primera vez. Estas son: mamífero: GnRH (mGnRH), lamprea GnRH-I (lGnRH-I) y lamprea GnRH-III (lGnRH-III), chicken GnRH-I (cGnRH-I) y cGnRH-II, catfish GnRH (cfGnRH), dogfish GnRH (dgGnRH), salmon GnRH (sGnRH), seabream GnRH (sbGnRH), herring GnRH (hGnRH), guineapig GnRH (gpGnRH), una variante hidroxilada de la forma de mamífero (Hyp⁹)mGnRH, tunicado GnRH-I (tGnRH-I) y tGnRH-II y por último pejerrey GnRH (pGnRH) (Stefano et al., 1997, Fradinger *et al.*, 2000, Montaner, com. personal).

Todas estas variantes se caracterizan por ser deca péptidos, con el extremo amino terminal ciclado formando un piroglutamato (pGlu), el extremo carboxilo terminal amidado (Gly-amida), y porque los residuos 1,4,9 y 10 se encuentran conservados.

El hecho de poseer los extremos amino y carboxilo conservados, sugiere que

estas regiones son importantes para la unión con el receptor, la resistencia a la degradación enzimática y el disparo de los eventos mediados por receptor en la liberación de las gonadotrofinas (Stefano, 1999).

mamífero	pGLU	HIS	TRP	SER	TYR	GLY	LEU	ARG	PRO	GLY
Guinea Pig	-	TYR	-	-	-	-	VAL	-	-	-
Chicken-I	-	-	-	-	-	-	-	GLN	-	-
Sea Bream	-	-	-	-	-	-	-	SER	-	-
Catfish	-	-	-	-	HIS	-	-	ASN	-	-
Salmon	-	-	-	-	-	-	TRP	LEU	-	-
Dogfish	-	-	-	-	HIS	-	TRP	LEU	-	-
Chicken-II	-	-	-	-	HIS	-	TRP	TYR	-	-
Lamprea-III	-	-	-	-	HIS	ASP	TRP	LYS	-	-
Lamprea-I	-	-	TYR	-	LEU	GLU	TRP	LYS	-	-
Tunicado-I	-	-	-	-	ASP	TYR	PHE	LYS	-	-
Tunicado-II	-	-	-	-	LEU	CYS	HIS	ALA	-	-
Herring	-	-	-	-	HIS	-	-	SER	-	-

Tabla 2: Secuencia de aminoácidos de las trece variantes de GnRH. El guión indica los mismos aminoácidos que en mamífero. Se especifican sólo los aminoácidos que varían con respecto a mGnRH.

En la actualidad, se sabe que el cerebro de todos los vertebrados, incluso el de humanos, expresan al menos dos formas de GnRH, una altamente conservada: cGnRH-II, y distintas formas que varían de acuerdo con la especie. En teleósteos, se han caracterizado además de cGnRH-II otras formas: sGnRH, cfGnRH, sbGnRH, mGnRH, hGnRH y pGnRH (Carolsfeld *et al.*, 2000, Montaner *et al.*, com. personal). La

distribución neuroanatómica varía en las diferentes especies y por lo general cGnRH-II se expresa en cuerpos neuronales localizados en el diencéfalo posterior o cerebro medio. Otras formas de GnRH (sGnRH, mGnRH y cGnRH-I) se encuentran asociadas con el nervio terminal y se expresan en neuronas distribuidas en el piso del cerebro anterior, principalmente en el área septal y preóptica.

En el pejerrey se expresan tres variantes moleculares de GnRH: cGnRH-II, sGnRH, y una tercer variante descrita por primera vez en el pejerrey, pGnRH por Stefano *et al.*, 1997 y Montaner *et al.*, (com. personal).

La distribución neuroanatómica de las variantes de GnRH en el encéfalo es la siguiente: un grupo de neuronas corresponde al *Nucleus olfacto retinalis* (NOR), ganglio que se localiza en posición ventral entre el bulbo olfatorio y la región anteroventral del telencéfalo, un segundo grupo localizado en el área preóptica anterior, más específicamente en el *Nucleus preopticus periventricularis* (NPP), y un tercer grupo de neuronas que corresponde al tegmentum dorsal del área mesencefálica, inmediatamente caudal a la comisura posterior (Stefano, 1999).

Como se mencionara anteriormente, el caso de los peces teleósteos es único, ya que al no poseer un sistema porta hipofisario, la adenohipófisis está directamente innervada por fibras hipotalámicas neurosecretoras (Peter *et al.*, 1990). Las neurohormonas producidas por estas fibras son liberadas en las proximidades de las células adenohipofisarias. Las terminales neurosecretoras pueden atravesar la membrana basal que las separa de las células y contactar directamente con ellas o finalizar en la membrana basal que separa la NH de la ADH (Peter *et al.*, 1990; Anglade *et al.*, 1993). Las fibras que secretan los diferentes neuropéptidos no se encuentran distribuidas libremente en la adenohipófisis sino que están asociadas con las células blanco. Por lo tanto la existencia de una asociación íntima entre un tipo celular particular y las fibras neurosecretoras, indicaría que esa neurohormona estaría involucrada en la regulación de

la actividad de ese tipo celular. Un ejemplo de esto es la asociación morfológica existente entre las fibras GnRHérgicas y los gonadotropos en el goldfish, *Carassius auratus* (Kah *et al.*, 1986).

Clásicamente, los gonadotropos eran considerados las células blanco primarias del neuropéptido GnRH, sin embargo, estudios recientes han demostrado que este neuropéptido también regula la síntesis y liberación de GH en goldfish (Marchant & Peter, 1986, Marchant *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1990a), *Oreochromis sp.* (Melamed *et al.*, 1995, 1996) y en la *Cyprinus carpio* (Lin *et al.*, 1993). También existen evidencias sobre la presencia de receptores para GnRH en somatotropos del goldfish (Cook *et al.*, 1991) y la existencia de una asociación morfológica de fibras ir-GnRH y este tipo celular en *Onchorynchus mykiss* (Parhar & Iwata, 1994). A pesar de esto, GnRH no puede ser considerado un secretagogo de GH universal en peces teleósteos. Por ejemplo en trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* no se han obtenido resultados claros (Le Gac *et al.*, 1993, Blaise *et al.*, 1995; Holloway & Leatherland, 1997) y el efecto de GnRH en la secreción de GH está ausente en el catfish, *Clarias gariepinus* (Bosma *et al.*, 1997).

En *Oreochromis mossambicus*, Weber, *et al.*, (1997), demostraron que la liberación de PRL de la PDR es también estimulada por GnRH, aunque la mayoría de las evidencias indican que en peces teleósteos las fibras productoras de GnRH inervan la PDP y la PI (Anderson *et al.*, 1995; Chiba *et al.*, 1996; Montero *et al.*, 1994; Moons *et al.*, 1989; Parhar & Iwata, 1994) y los lactotropos se encuentran en la PDR.

En el pejerrey, se demostró una asociación íntima entre las fibras de GnRH y las células productoras de GH y PRL (Stefano, 1999) y posteriormente se determinó la presencia de receptores a GnRH en estas células (Stefano, 1999).

Sin embargo, existe muy poca información sobre la regulación de la liberación de SL. Olivereau en 1969 comprobó que autotransplantes de hipófisis mostraban degeneración de la NH y unas pocas células PAS positivas de tamaño muy pequeño

(presumiblemente células somatolactínicas), sugiriendo que la síntesis y secreción de SL estaría bajo control positivo de factores hipotalámicos. Posteriormente estudios histológicos demostraron que fibras originadas en el hipotálamo están en íntimo contacto con las células productoras de SL de la PI (Rand Weaver *et al.*, 1991b, Kaneko *et al.*, 1993a, Olivereau & Rand-Weaver, 1994a,b). Por otra parte, Kakizawa *et al.*, en 1997 observaron que dopamina y epinefrina inhiben la liberación de SL mientras que serotonina y el factor liberador de corticotrofinas (CRF) estimulan la liberación de SL inhibida por dopamina.

Existen también algunas pocas evidencias que sugerirían que las células productoras de SL estarían reguladas por GnRH: En la trucha arco iris, *O. mykiss*, se vió que GnRH bloquea la acción inhibitoria de dopamina sobre la secreción de SL en cultivo primario de células hipofisarias (Kakizawa *et al.*, 1997) y en la misma especie Parhar & Iwata (1994) observaron fibras GnRHérgicas en contacto con células SL. Por otra parte en salmónidos como, *O. kisutch* se detectaron variaciones en los niveles plasmáticos de SL en correlación con el ciclo gonadal (Rand-Weaver *et al.*, 1992, Rand-Weaver & Swanson, 1993).

En base a esta bibliografía y a los resultados ya descriptos en el capítulo II referidos a las variaciones entre las células somatolactínicas y la maduración gonadal se plantea el siguiente objetivo:

III-II Objetivo

- Establecer la relación entre las células productoras de SL y el neuropéptido GnRH determinando en primer lugar si existe una asociación morfológica entre las fibras de GnRH y las células somatolactínicas y de verificarse esto analizar la presencia de sitios de unión a GnRH en estas células.

III-III Materiales y Métodos

a) Asociación morfológica entre fibras GnRHérgicas y las células productoras de gonadotrofinas y somatolactina.

Animales

Ejemplares de pejerreyes adultos de ambos sexos fueron capturados con redes de pesca, en la Laguna Salada Grande, Partido de General Madariaga, Provincia de Buenos Aires. Los cerebros junto con las hipófisis fueron fijados *in situ* con una solución de paraformaldehído 4%, ácido pícrico 0.4%, en buffer fosfato salino (PBS, 0.05M, pH 7.4) antes de ser removidos.

Procesamiento de las muestras

Una vez removidos los cerebros junto con las hipófisis, las muestras fueron fijadas 24 hs, y luego se almacenaron en una solución de sacarosa 15% en PBS, por 24 hs a 4°C. Posteriormente fueron criopreservadas a -20°C en sacarosa 30%, polivinilpirrolidona (PVP-40) 15%, etilenglicol 30% en PBS 0,05. hasta el momento en que se realizaron los cortes (Watson *et al.*, 1986).

Las muestras fueron incluidas en O.C.T. (Tissue-Tek Miles, USA) y cortadas en crióstato a una temperatura de -20°C. Los cortes parasagittales (30 µm) se montaron en portaobjetos lavados en una solución de ácido clorhídrico/etanol y luego gelatinizados. Este paso fue fundamental para evitar que los cortes se desprendieran.

Doble inmunomarcación

Los cortes fueron hidratados por 20 min en una solución de PBS-Tritón X-100 0.1% (PBS-T), tratados luego en suero normal de caballo e incubados toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario LRH 13 (ver Tabla 3). Este anticuerpo reconoce la región alrededor de los residuos de serina y tirosina de las formas conocidas de GnRH, pero tiene baja afinidad por la forma cGnRH-II en la cual la tirosina esta reemplazada por la histidina (Park & Wakabayashi, 1986) (Tabla 2). Luego de un lavado en PBS, se aplicó el antisuero secundario biotinado anti-raton IgG (Sigma Chemicals Co.) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de transcurrido este tiempo, los cortes se volvieron a lavar en PBS, y se trataron con el complejo Avidina-estreptavidina (ABC) (Vector Laboratories) y se revelaron con una solución 0.03% 3,3' diaminobencidina (DAB) en buffer PBS (pH: 7.6) y 0.02% de H₂O₂. Los cortes fueron lavados exhaustivamente en PBS-T y luego se los incubó con el segundo anticuerpo primario (anti-crGtH y anti-rdSL) (Tabla 3), toda la noche a 4°C. Luego del lavado con PBS-T, se los incubó con el segundo anticuerpo secundario anti-conejo IgG (Sigma Chemicals Co.) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavar en PBS-T, los cortes fueron incubados con el complejo ABC (Vector Laboratories) y la actividad peroxidasa visualizada con 3-amino, 9-etil carbazol (AEC). Finalmente los cortes fueron lavados en agua destilada y montados en PBS-glicerina. El cromógeno DAB, usado para revelar el primer anticuerpo primario da una coloración marrón, mientras que el cromógeno AEC utilizado para revelar el segundo anticuerpo primario da una coloración rojiza, lo que permite distinguirlos fácilmente.

Controles

La especificidad de los antisueros fue validada por preadsorción con el antígeno correspondiente cuando se disponía del mismo (mGnRH) o por sustitución del antisuero primario con suero normal de caballo en PBS (GtH, SL).

Antisuero	Dilución	Generado en	Generado contra	Provisto por
LRH 13	1:2000	ratón	mGnRH	Dr. K. W. Wakabayashi
anti-crGtH	1:1000	conejo	croaker GtH	Dr. P. Thomas
anti-rd SL	1:1000	conejo	red drum SL	Dr. P. Thomas

Tabla 3: Antisueros utilizados en los experimentos de doble marcación.

b) Determinación de sitios de unión a GnRH en gonadotropos y células productoras de somatolactina.

Animales

Para cada uno de los experimentos (n:5) diecisiete peces sexualmente maduros provenientes de la Estación Hidrobiológica de Chascomús (Subsecretaría de Pesca y Recursos Naturales, Ministerio de Asuntos Agrarios, Provincia de Buenos Aires) fueron transportados al Laboratorio en bolsas plásticas suplementadas con aire. Allí se los decapitó y se les extrajo la hipófisis.

Cultivo primario de células hipofisarias

Una vez removidas las hipófisis, estas fueron colocadas en cápsulas de Petri (35 mm) en medio de cultivo Leivovitz (L-15, Sigma, St. Louis, MO), conteniendo 26 mM de bicarbonato de sodio (Sigma, St. Louis, MO), 50 UI/ml de penicilina (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) y 50 µg/ml de estreptomycin (Gibco, BRL). En este medio las hipófisis fueron disociadas mecánicamente con tijeras estériles. Las porciones de tejido fueron luego transferidas a un tubo tipo Falcon (15 ml) con 10 ml de PBS(K) potásico estéril (KH₂PO₄/ K₂HPO₄ 10 mM, ClNa 0.15 M, pH 7.4) y se dejaron decantar. Luego el PBS(K) fue removido y reemplazado por 2 ml del mismo buffer fresco. La dispersión enzimática fue realizada incubando el tejido por 20 min a 25 °C, adicionando 200 µl de Tripsina porcina tipo II 1% v/v (Sigma Chemicals Co.) y 50 µl de una solución 20% p/v de D-glucosa (Gibco, BRL). La reacción fue terminada adicionando 8 ml de medio de cultivo suplementado con 5% v/v de suero fetal bovino (Gibco, BRL). La suspensión celular se obtuvo por trituración con una pipeta Pasteur (Falcon, Becton-Dickinson, Lincoln Park, NY) afinada a fuego. Una vez que se obtuvo una suspensión densa de células, éstas se lavaron resuspendiéndolas en 8 ml de medio de cultivo suplementado con suero y se centrifugando a 1500 rpm por 8 min. El pellet obtenido se resuspendió en 12 ml de medio de cultivo suplementado con suero. Se determinó la viabilidad celular según el test de Trypan-Blue (1.5% p/v), contando las células en cámara de Neubauer.

La suspensión celular se sembró (1 ml) en multiplacas de 24 placas (Costar, Corning Costar, Cambridge, MA) en diferentes condiciones, a una densidad aproximada de 4000 células vivas por placa. Para permitir la adhesión de las células al sustrato éstas fueron incubadas por una hora a 25 °C en estufa con 95%O₂-5%CO₂. Al cabo de este tiempo se reemplazó el medio por 1 ml de medio de cultivo fresco, y se incubaron nuevamente. Cada 4 días se reemplazó la mitad del medio de cultivo.

Se analizaron diferentes condiciones de siembra:

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

-Siembra sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro (Eric-Scientific) pretratados con polietilenimina (PEI) (Sigma Chemicals Co.).

-Siembra sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro (Eric-Scientific) sin ningún tipo de tratamiento.

-Siembra directamente sobre la placa.

-Siembra sobre la placa pretratada con PLL.

-Siembra sobre la placa pretratada con PEI.

En las diferentes condiciones, la sobrevida analizada a las cinco horas, fue buena. Sin embargo, cuando se analizaron al día siguiente, las células sembradas sin cubreobjeto presentaron baja viabilidad, mientras que aquella sembradas sobre cubreobjeto mostraron buena sobrevida. No se encontraron mayores diferencias en los cultivos cuyos cubreobjetos fueron pretratados o no. Con estos resultados se decidió cultivar las células directamente sobre el cubreobjeto sin pretratamiento.

Antes de realizar los ensayos de ligamiento e inmunocitoquímica, las células fueron incubadas a 25 °C una noche a en condiciones de humedad saturante, 95%O₂-5%CO₂. Se eligió esta temperatura de incubación dado que es era la adecuada para cultivo de células hipofisarias de otros peces teleósteos (Bosma *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1990b; Ribeiro *et al.*, 1982).

Radioiodinación de la buserelina

Para determinar los sitios de unión a GnRH se utilizó un análogo superactivo de GnRH (GnRH-A, buserelina, Hoescht, Argentina). Ensayos previos en homogenatos de

hipófisis de pejerrey (n: 10, 36 mg) mostraron la factibilidad de utilizar busarelina ((K_d : -0.2058 nM y B_{max} : 1.227 fmol/mg de tejido) como análogo. Esta fue cedida gentilmente por la Dra. Damasia Becú) y su composición es (D-Ser[Tbu]₆,ds-Gly-NH₂)-GnRH-etilamida.

Para marcar radioactivamente la busarelina, se siguió un protocolo similar al descrito por Clayton *et al.*, (1979) y Chamson-Reig *et al.*, (1997); utilizando Cloramina-T (Cl-T, Sigma Chemicals Co.) en concentraciones limitantes. Se comenzó agregando 2 mCi de ¹²⁵I llevado a 5 µl con buffer fosfato 0.5 M a 2 µg de GnRH-A diluida en 5 µl de ácido acético 0.1N. La reacción comenzó con el agregado de Cloramina-T (0.2 µg en 10 µl de buffer fosfato 0.05 M, pH 7.5) y dejando reaccionar por 5 min. Luego se realizó una segunda reacción a la misma concentración y por 2 min. La reacción fue frenada por dilución agregando acetato de amonio 2 mM pH 4.5. El producto de la reacción se sembró en una columna de Carboxi Metil Celulosa (Sigma Chemicals Co., 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 100 mM, pH 4.5.

Las fracciones se recogieron en 150 µl de acetato de amonio 2 mM pH 4.5, BSA, 5% p/v hasta un volumen final de 1.5 ml. De cada fracción se tomaron 10 µl para la determinación del perfil de marcación en contador gamma (Clinigamma 1272, LKB-Wallac, Suiza).

Test de ligamiento para sitios de unión a GnRH-A en hipófisis de rata

Para determinar las fracciones de elución con mayor actividad específica, se realizó un test de unión utilizando homogenatos de hipófisis de rata adulta (30 días). De cada fracción del pico radioiodinado correspondiente al análogo superactivo se

determinó la unión máxima y la inespecífica. Para ello se prepararon 5 tubos de incubación (3 para la unión máxima y 2 para la inespecífica) por cada fracción del eluido de la columna. En cada tubo se colocó aproximadamente 0.35 mg de tejido, (aproximadamente 800 µg de proteínas totales) y 300 µl de buffer de incubación [Tris-HCL 10 mM, BSA 0.1% p/v (Sigma Chemicals, Co.) ditioneitol 1 mM (Sigma Chemicals, Co)]. Los homogenatos fueron incubados durante 2 hs en baño de hielo luego del agregado de ¹²⁵I-GnRH-A (60.000-80.000 cpm) en un volumen total de 500 µl. Los ensayos de unión inespecífica se realizaron con el agregado de 0.2 mM de GnRH-A radioinerte. La reacción se detuvo por centrifugación a 13.000 rpm en microcentrífuga durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue descartado y la radioactividad medida en un contador gamma.

Localización de los sitios de unión a GnRH

Los ensayos de unión se llevaron a cabo en cultivos de 7 días, los cuales fueron lavados por 5 min en una solución salina balanceada, BSS (CaCl₂ 1 mM, KCl 5.4 mM, KH₂PO₄ 0.4 mM, MgCl₂ 1 mM, MgSO₄ 0.8 mM, NaCl 140 mM, Na₂ HPO₄ 1.3 mM, D(+) galactosa 5 mM, piruvato de Na 5 mM, Hepes 5 mM, pH 7.4). La solución de BSS fue removida y se volvió a agregar BSS fresca. Al cabo de 20 min la BSS fue descartada y reemplazada por 200 µl de BSS conteniendo ¹²⁵I-GnRH-A (80.000 cpm; 500-800 µCi/µg). Las muestras se incubaron 20 min a temperatura ambiente (22 ± 1°C). 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 cuatro veces con 1 ml de BSS y fijadas con 1.5 ml de paraformaldehído 2 %p/v y glutaraldehído 2%v/v en buffer fosfato, 0.1M, pH 7.4, durante 20 min en baño de hielo. Una vez fijadas, estas fueron removidas del hielo y a

temperatura ambiente fueron lavadas con las siguientes soluciones: 5 min con buffer fosfato 0.1M pH 7.4 y luego, también por 5 min en 1 ml de PBS 10 mM (0.15 ClNa, pH 7.4). Finalmente, 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-Tritón (PBS-T), 0.25%v/v.

Inmunocitoquímica

Luego de la fijación y los lavados posteriores, las células fueron removidas del hielo e incubadas con los antisueros: anti-crGtH (1:1000) y anti-chumSL (1:1000) (ver Tabla 1) por 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron lavadas tres veces con PBS-T y se las incubó por 40 min con el antisuero secundario biotinilado, IgG anti-conejo (Sigma Chemicals Co.). Luego de lavarlas con PBS-T se las incubó por 40 min con el complejo ABC (complejo avidina-biotina peroxidasa) (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Una vez transcurrido el tiempo de incubación se volvieron a lavar con PBS-T y las células fueron reveladas. Se utilizaron tres cromógenos diferentes: DAB, AEC y isotiocianato de fluoresceína (FITC). El cromógeno que dio una mejor inmunomarcación fue el AEC, por lo que fue el de elección en todos los experimentos subsiguientes. Para la visualización de las células se utilizó un microscopio de luz invertida (Olympus). La especificidad de los antisueros se determinó reemplazando el antisuero primario con suero normal de caballo.

Una vez realizada la inmunocitoquímica, los cubreobjetos se dejaron secar al aire y en cuarto oscuro fueron embebidos con emulsión nuclear NTB2 (Kodak, Eastman Kodak, Rochester, NY) a una concentración de 1:1 en agua destilada. y se expusieron en cámaras oscuras por 10 días a 4°C.

Al cabo de los 10 días los cubreobjetos se revelaron con 2,4 diampholdiclorhidrico (Aldrich) por 5 min, se lavaron en agua destilada por 5 min y se

fijaron con tiosulfato de sodio 20%v/v. Los autoradiogramas se montaron en PBS-glicerina 1:1 sobre un portaobjeto y se observaron y fotografiaron con un microscopio (Polyvar, Reichert) equipado con ópticas con contraste interdiferencial de Nomarski (CIF).

III-IV Resultados

Doble inmunomarcación

Por medio de la técnica de inmunomarcación doble se pudieron distinguir en un mismo corte las fibras GnRHérgicas que aparecen en marrón, reveladas con DAB, de las células adenohipofisarias que aparecen teñidas con una coloración rojiza, reveladas con AEC.

Las fibras de GnRH inmunomarcadas con LRH 13 se observaron atravesando el tallo neurohipofisario y alcanzando las tres zonas de la ADH: PDR, PDP y PI (Fig. 21a). Estas fibras presentan un aspecto típico de “cuentas de rosario”.

El anti-crGtH reveló un grupo de células que como se explicó en el capítulo I se encuentran en la PDP y en el borde externo de la PI. Las fibras de GnRH que bajan por el tallo y llegan a la PDP y a la PI se asocian a ellas (Fig. 21b). Es importante hacer notar que el antisuero que se utilizó para identificar a las células gonadotróficas no discrimina entre los dos tipos de gonadotrofinas (GtH I y GtH II).

La inmunomarcación con anti-rdSL mostró un grupo de células bordeando a la NH en la PI. La doble inmunomarcación reveló una asociación morfológica entre las fibras de GnRH y estas células (Fig. 21c y d).

Cultivo primario de células hipofisarias

Por disociación mecánica y enzimática de las células hipofisarias del pejerrey se obtuvieron 4000 células viables por placa determinadas por el método de exclusión del Trypan blue. Esta cifra representa aproximadamente 90% de células viables sobre el total de las disociadas. A las dos semanas de cultivo la viabilidad se seguía manteniendo alta.

Los pretratamientos de los cubreobjetos tanto con PLL como con PEI no mostraron diferencias ni en la adhesión ni en la sobrevivencia, por lo tanto los cubreobjetos se utilizaron sin ningún tipo de pretratamiento. En cambio, cuando el cultivo se realizó directamente sobre la placa, la sobrevivencia y la adhesión disminuyeron considerablemente (Tabla 4).

	cubre/PLL	cubre/PEI	cubre	placa/PLL	placa/PEI	placa
5 hs	+	+	+	+	+	+
24 hs	+	+	+	+/-	+/-	+/-
48 hs	+	+	+	-	-	-

Tabla 4: Resultado de las diferentes condiciones de siembra, (cubre/PLL: siembra sobre cubreobjeto tratado con poli-L-lisina (PLL), cubre/PEI: siembra sobre cubreobjeto tratado con polietilenimina (PEI), cubre: siembra sobre el cubreobjeto sin tratar, placa/PLL: siembra sobre la placa tratada con PLL, placa/PEI: siembra sobre la placa tratada con PEI, placa: siembra directamente sobre la placa. +: alto porcentaje de sobrevivencia, +/-: medio y -: bajo).

Caracterización inmunocitoquímica de las células productoras de GtH y SL en cultivos primarios de hipófisis

En cultivos de un día las células fueron observadas y medidas, utilizando una escala milimetrada adosada al ocular del microscopio. Las células inmunoreactivas a GtH (ir-GtH) midieron aproximadamente entre $9.71 \pm 2.34 \times 9.02 \pm 2.12 \mu\text{m}$ (n:17; rango 6.5-13 μm) y presentaron una forma redondeada con el núcleo en posición central o levemente excéntrico (Fig. 22a).

Las células ir-SL presentaron forma elongada, con núcleo excéntrico y abundante citoplasma (Fig. 22b). El tamaño varió entre $8.4 \pm 0.89 \times 8.8 \pm 1.78 \mu\text{m}$ (n:5; rango 8-12 μm).

En cultivos de siete días las células presentaron las mismas características que en el día 1. El porcentaje de las diferentes células permanece similar. Sin embargo en los cultivos de siete días se observaron algunas células gliales, probablemente astrocitos (Fig.22c).

Localización de los sitios de unión a GnRH en las células ir-GtH e ir-SL

Los primeros ensayos de unión se realizaron tanto en cultivos de un día como en cultivos de siete días y no se observaron diferencias cualitativas, por lo que los siguientes ensayos se realizaron a los siete días.

Las imágenes autoradiográficas mostraron, como era de esperar gránulos de plata asociados a los gonadotropos (Fig. 23 a y b). Cuando se incubó con un exceso de GnRH-A radioinerte (100 nM) no se observaron gránulos de plata asociados en ningún casos (Fig. 23c).

Las células ir-SL también mostraron numerosos gránulos de plata asociados

cuando se las incubó con ^{125}I -GnRH-A (Fig. 24 a, b y c). La no aparición de los gránulos luego de la coincubación con busserelina radioinerte reveló la especificidad de la unión.

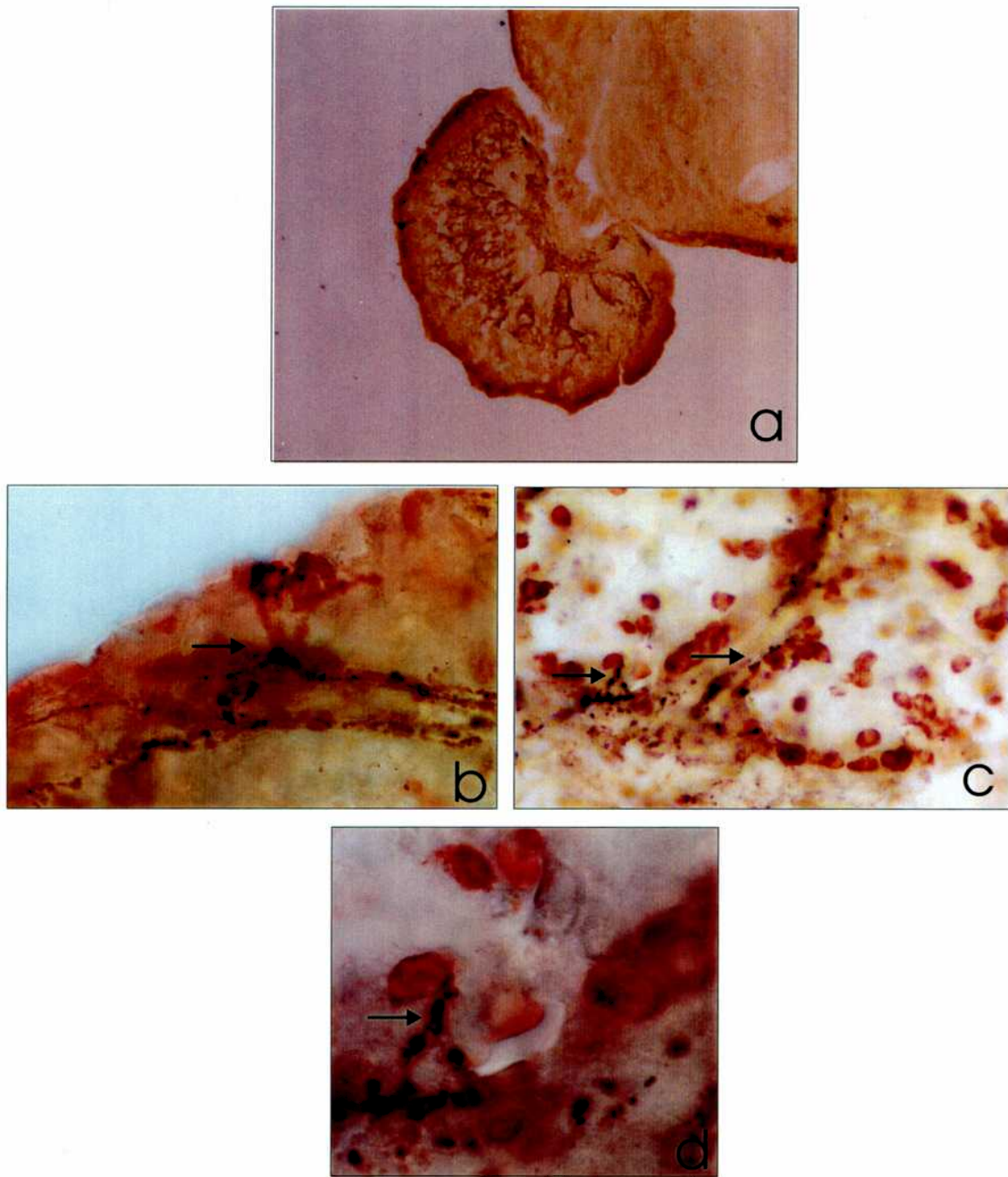


Fig. 21: Cortes parasagittales de hipófisis de pejerrey adulto. a) Fibras GnRHérgicas alcanzando las tres área de la ADH. La PDR se encuentra a la izquierda (x64), b) Células ir-GtH en contacto con fibras de GnRH (flechas) en la PDP (x600), c) Asociación entre las células ir-SL y las fibras de GnRH en la PI (flechas) (x600), d) Detalle de las fibras poniéndose en contacto con las células productoras de SL (x960).

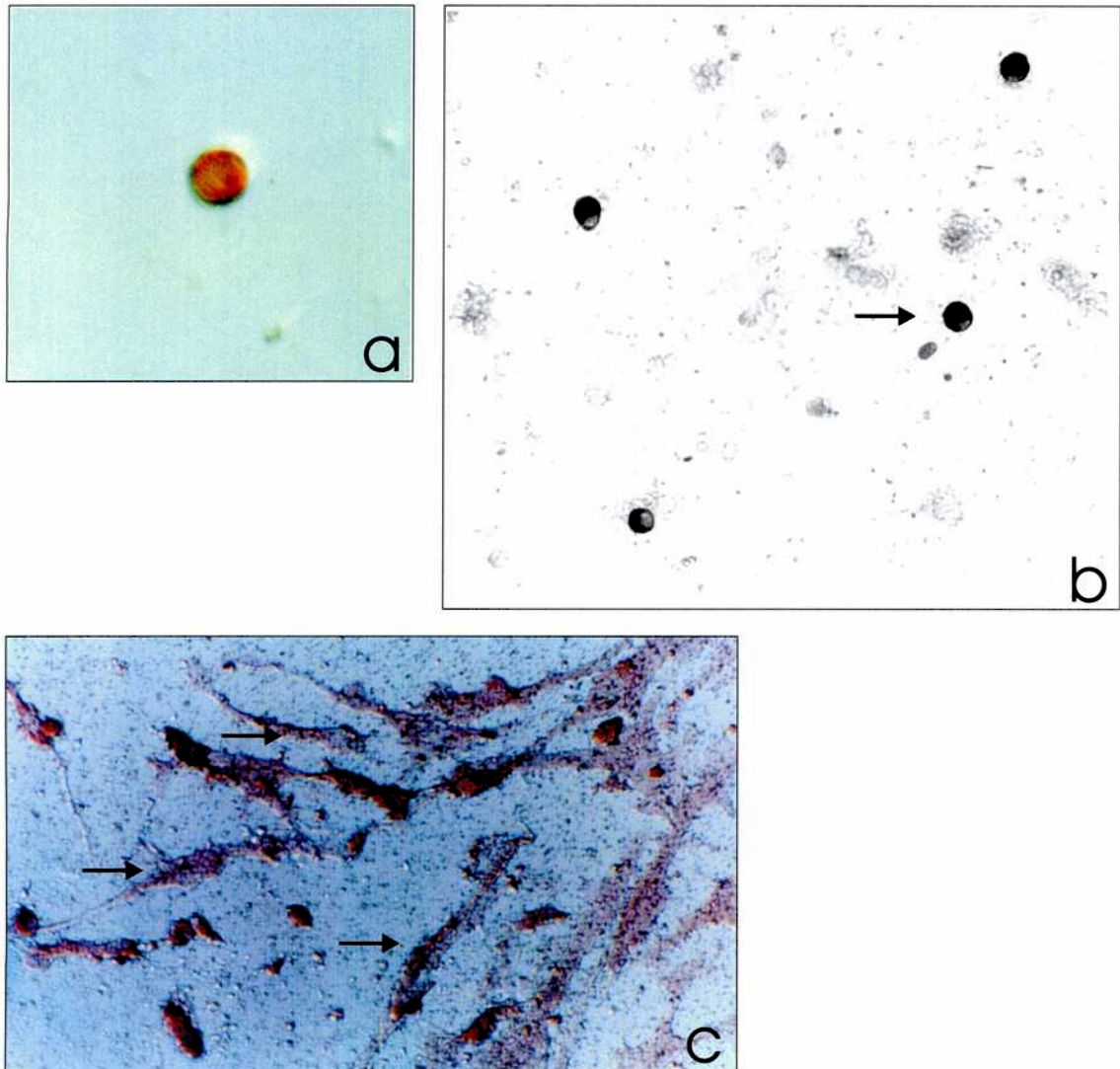


Fig. 22: a) Célula ir-GtH en cultivo (x1125), b) Cultivo de células hipofisarias donde se inmunomarcaron a las células productoras de SL. La flecha indica a una de las cuatro células marcadas (x32), c) cultivo de siete días en donde se observa gran cantidad de células gliales (flechas) (x50).

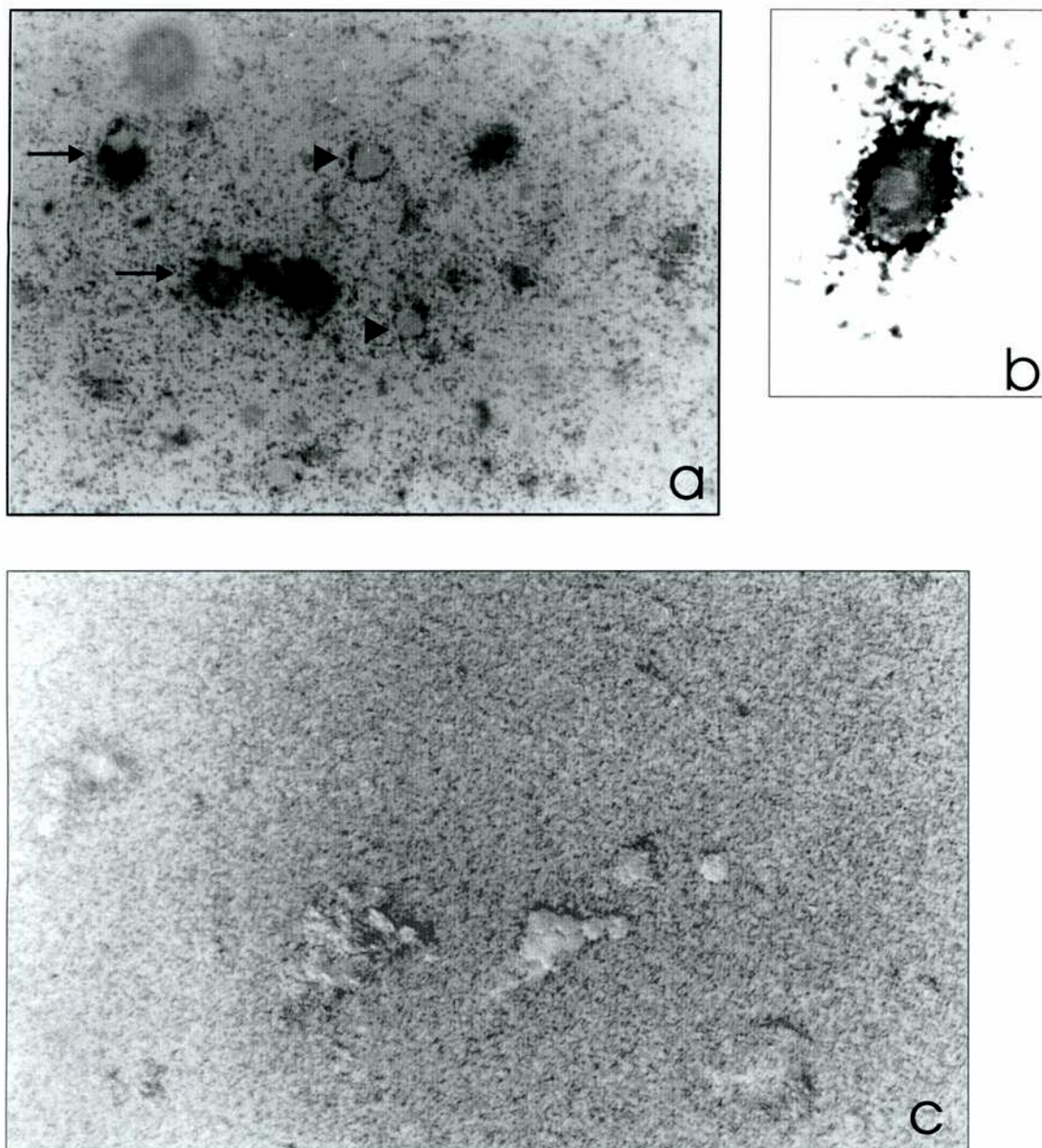


Fig. 23: a) Localización autoradiográfica de ^{125}I GnRH-A sobre las membranas de células inmunomarcadas con anti-crGtH (flechas). Las cabezas de flecha indican células no inmunomarcadas pero con sitios de unión a ^{125}I GnRH-A (x500), b) Detalle de célula ir-GtH con gránulos de plata asociados (x1125), d) Un exceso de GnRH-A radioinerte suprime la unión del ^{125}I GnRH-A en todos los tipos celulares (x500).

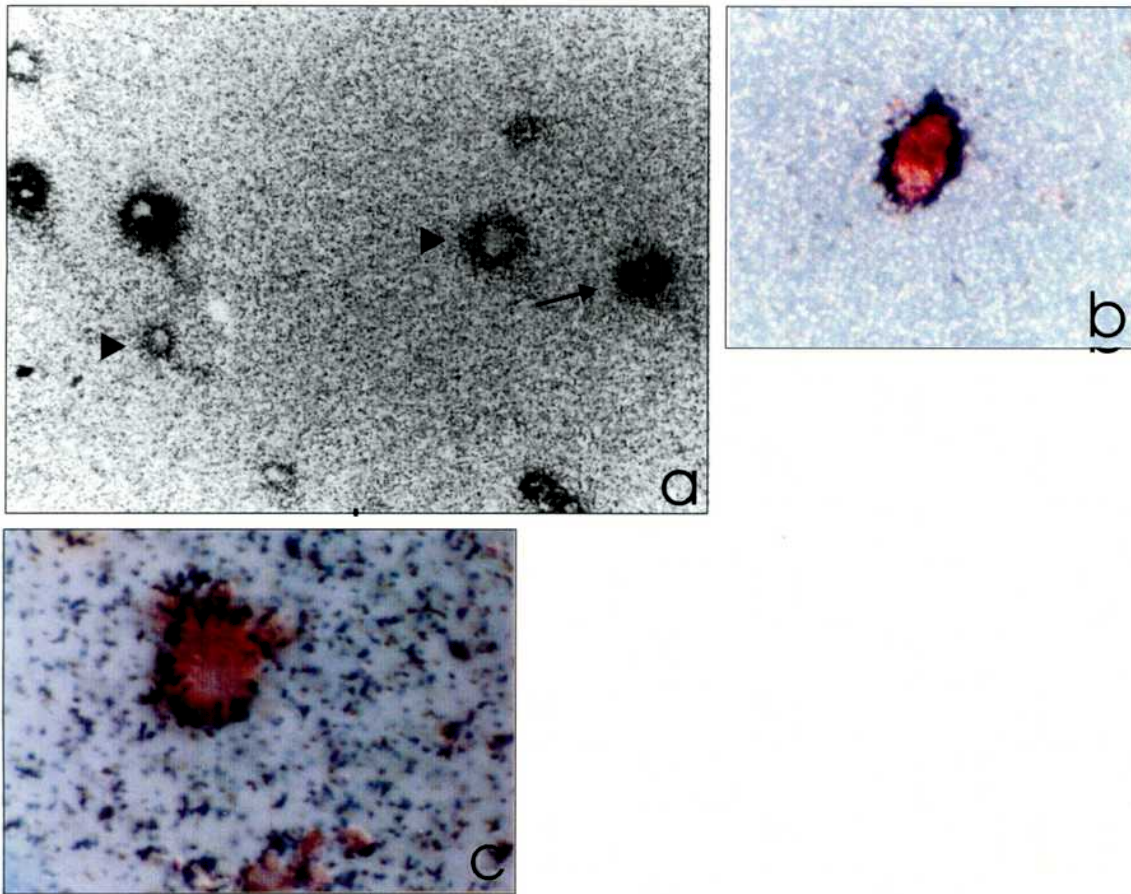


Fig. 24: Localización autoradiográfica de ^{125}I GnRH en las membranas de las células ir-SL reconocidas con anti-chum salmon SL (flechas), también se observan células no inmunomarcadas con gránulos de plata asociados (cabeza de flecha)(x500), b) Detalle de célula ir-SL con gránulos de plata asociados (se observan en negro) (x 600x) y en c) Detalle de célula productora de SL con gránulos de plata asociados, observadas con microscopio interdiferencial de Nomarski (x1125).

III-V Discusión

En tetrápodos, el control de la síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias es regulada principalmente por la liberación de sustancias neuroactivas al sistema portal hipofisario. En peces teleósteos, sin embargo, al no existir un sistema portal, la inervación de las células secretoras se realiza en forma directa mediante fibras que llegan hasta sus células blanco a través del tallo hipofisario. Muchas de estas fibras se originan a nivel hipotalámico y penetran en la ADH vía las extensas interdigitaciones del tejido neural (Batten *et al.*, 1999). Distintos neuropéptidos principalmente de origen hipotalámico han sido identificados en las fibras que inervan la ADH de peces. Uno de los más conocidos es GnRH. Este neuropéptido inerva principalmente a los gonadotropos (Batten *et al.*, 1999).

Los estudios inmunocitoquímicos en pejerrey, han puesto de manifiesto que las fibras GnRHérgicas alcanzan una amplia distribución en las tres zonas de la ADH: PDR, PDP y PI.

La presencia de fibras en la PI, donde las células productoras de SL están tan estrechamente vinculadas a la NH, de alguna manera está indicando que existiría algún tipo de asociación. Los experimentos de doble inmunomarcación claramente muestran una asociación morfológica entre las fibras de GnRH y las células productoras de SL similar a la que ocurre entre las fibras GnRHérgicas y los gonadotropos.

Si bien se ha puesto de manifiesto una estrecha asociación entre GnRH y células ir-SL, podría suceder que esa célula en contacto con la terminal nerviosa no tuviese los receptores específicos y estos se encontraran localizados en células cercanas que respondieran a ese estímulo. Por lo tanto era importante investigar la presencia de receptores a GnRH (sitios de ligamiento) en las células productoras de SL. Los sitios de unión específicos para GnRH se localizaron no solamente en las células GtH sino

también en las células productoras de SL.

Luego de la incubación de un cultivo primario de hipófisis de pejerrey con ^{125}I GnRH-A, una cantidad significativa de gránulos de plata se asoció específicamente tanto con los gonadotropos como con las células ir-SL.

En la literatura existen evidencias farmacológicas y morfológicas que involucran a GnRH en la liberación de SL. Los experimentos realizados por Kakizawa *et al.* (1997) donde demuestra que GnRH revierte los efectos inhibitorios de dopamina, sumados a las observaciones realizadas por Parhar & Iwata (1994) en *O. mykiss* apoyan nuestros resultados.

Por otro lado, los resultados presentados por Stefano (1999) también en pejerrey demostrando que existe una asociación entre las fibras de GnRH y las células productoras de PRL y GH contribuyen a explicar la presencia de fibras de GnRH en la PDR donde, como mencionáramos en el primer capítulo, sólo se han detectado células productoras de PRL y ACTH. También en las células GH y PRL se han detectado sitios de unión para GnRH (Stefano, 1999). Estos resultados concuerdan con experimentos fisiológicos realizados en otras especies, donde se observa una liberación tanto de PRL como de GH estimulada por GnRH (Weber *et al.*, 1997; Marchant *et al.*, 1989, Trudeau *et al.*, 1992).

Como se ha comentado en la introducción, existen tres variantes de GnRH en pejerrey. Si bien no se sabe fehacientemente cual es la variante que expresan las fibras que contactan con las células ir-SL debido a la falta de especificidad de los antisueros utilizados, los resultados presentados por Stefano *et al.* en 1997 sugerirían que ésta sería pGnRH puesto que es la única variante identificada mediante HPLC y RIA, en la hipófisis de pejerrey. Esta variante se sintetizaría a nivel del área preóptica en el núcleo preóptico periventricular desde donde nacen las fibras que inervan a la hipófisis (Stefano, 1999). Asimismo, estos resultados sugerirían que esta nueva variante de

GnRH, también inervaría los diferentes tipos celulares en la hipófisis de pejerrey y que éstas células con sitios de unión a GnRH responden simultáneamente a esta variante de GnRH durante el ciclo sexual. La falta de conexión directa de las restantes variantes de GnRH (sGnRH y cGnRH II) con la hipófisis no descarta totalmente la posible acción de éstas sobre los distintos tipos celulares hipofisarios, puesto que la neurohormona podría alcanzar la hipófisis por vía sanguínea. Esta hipótesis es reforzada por el hecho que en *Clarias gariepinus*, donde a pesar de no haberse encontrado una inervación directa de neuronas ir-cGnRH II en la hipófisis, cGnRH II es 150 veces más potente que cfGnRH en su capacidad de inducir la liberación de GtH II aunque el contenido hipofisario de cfGnRH es 700 veces superior a cGnRH II (Schulz *et al.*, 1995).

CONCLUSIONES FINALES

Los resultados obtenidos a lo largo del presente trabajo de Tesis nos permiten concluir lo siguiente:

▶ En la hipófisis del pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, los diferentes tipos celulares se distribuyen de la siguiente manera: Las células productoras de PRL se encuentran en el borde externo de la PDR, mientras que los corticotropos se ubican en la misma área pero internamente, bordeando a la NH. El antisuero (anti-hACTH) utilizado para poner en evidencia los corticotropos mostró reacción cruzada con células de la PI, indicando presuntamente la presencia de células productoras de MSH. Las células productoras de GH se localizan en la PDP bordeando a la NH. En esta misma zona también se encuentran las células productoras de TSH y los gonadotropos. Estos últimos también se ubican en el borde externo de la PI. Las células productoras de SL se encuentran en la PI bordeando la NH.

▶ En la hipófisis del pejerrey existirían células que expresan GtH I, células que expresan GtH II, y células que expresan ambas gonadotrofinas.

▶ La somatolactina en el pejerrey se puso en evidencia utilizando cuatro antisueros diferentes. Todos los antisueros revelaron por Western blot una banda principal de aproximadamente 33 kD. Por otra parte mediante la técnica de PAS se pudo determinar que las células ir-SL son PAS positivas. Estos resultados indicarían que SL en la hipófisis del pejerrey está glicosilada.

► El área de las células ir-SL muestra grandes diferencias entre las hembras activas sexualmente o vitelogénicas y las hembras inactivas o no vitelogénicas. Una correlación positiva se observa entre el área de las células productoras de SL y el GSI%. En machos, a pesar de observarse una tendencia a aumentar el área de las células ir-SL con el GSI%, esta correlación no fue estadísticamente significativa. Estas observaciones concuerdan con resultados obtenidos en otras especies por otros autores y de alguna manera estarían involucrando a la SL en algunos aspectos de la reproducción.

► Se observa una clara asociación morfológica entre las células productoras de SL y las fibras GnRHérgicas. Los experimentos de localización de sitios de unión para GnRH mostraron que las células productoras de SL tienen receptores para este neuropéptido y que éste por lo tanto puede ser uno de los responsables de regular su síntesis y/o liberación.

Si analizamos cada uno de estos resultados podemos ver que la SL se encuentra altamente conservada, como ya se citó, ya que cualquiera de los antisueros utilizados, que fueron desarrollados en representantes de órdenes tan heterogéneos como Perciformes, Salmoniformes y Cypriniformes, reconocen a la SL de pejerrey. Las células productoras de SL varían con el ciclo sexual, esto se ve claramente en hembras. La asociación entre las células ir-SL y las fibras de GnRH, y la presencia de sitios de unión a GnRH en estas células sugerirían una relación entre la SL y la reproducción. Debemos, sin embargo aclarar que también se han observado sitios de unión a GnRH en lactotropos, somatotropos (Stefano *et al.*, 1999) y gonadotropos. Esto estaría indicando o bien que GnRH tendría un amplio rol regulando la actividad de muchas células hipofisarias o que GnRH actuaría como un controlador general de

aquellas hormonas relacionadas con la reproducción. Si bien es claro el papel de las gonadotrofinas y la hormona de crecimiento en los procesos reproductivos, no es tan claro el rol de la prolactina.

A partir de estas conclusiones se abren nuevos e interesantes interrogantes. Por un lado determinar *in vitro* e *in vivo* el efecto directo de GnRH sobre la síntesis y/o liberación de SL. Por otra parte diseñar experimentos que permitan determinar el efecto que SL ejerce sobre las gónadas. Finalmente queda un gran interrogante por dilucidar y es la presencia o no de SL en otros vertebrados.

BIBLIOGRAFIA

- Amemiya, Y., Sogabe, Y., Nozaki, M., Takahashi, A., & Kawauchi, H. (1999). Somatolactin in the white sturgeon and African lungfish and its evolutionary significance. *Gen Com Endocrinol* 114(2), 181-190.
- 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.
- Anglade, I., Zandbergen, T. and Kah, O. (1993). Origin of the pituitary innervation in the goldfish. *Cell Tissue Res* 273: 345-355.
- Astola, A., Pendón, C., Ortiz, M. & Valdivia, M. (1996). Cloning and expression of somatolactin, a pituitary hormone related to growth hormone and prolactin from gilthead, *Sparus aurata*. *Gen Comp Endocrinol* 104, 330-336.
- Ayson, F.G., de Jesus, E.G., Amemiya, Y., Moriyama, S., Hirano, T. & Kawauchi, H. (1999). Isolation and cDNA cloning of somatolactin in rabbitfish (*Siganus guttatus*). *Gen Comp Endocrinol* 115(2), 292-300.
- Ball, J.N. & Baker, B.I. (1969). The pituitary gland: Anatomy and histophysiology. En "Fish Physiology", Vol. 2, The Endocrine System". Editado por W. Hoar and D. Randall, Academic Press, New York. pp.1-110.

-
- Ball, J.N. & Batten, T.F.C. (1981). Pituitary and melanophore responses to background in *Poecilia latipinna* (Teleostei): Role of the pars intermedia PAS cells. *Gen Comp Endocrinol* 44, 233-248.
- Ball, J.N., Uchiyama, M., & Pang, P.K.T. (1982). Pituitary responses to calcium deprivation in a euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*, adapted to artificial seawater. *Gen Comp Endocrinol* 46, 480-485.
- Batten, T.F.C. & Schreibman, M.P. (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., Moons, L. & Vandesande, F. (1999). Inervation and control of the adenohipophysis by hypothalamic peptidergic neurons in teleosts fishes: EM immunohistochemical evidence. *Microsc Res Techniq* 44, 19-35.
- Blaise, O., LeBail, 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 Physiol C* 110,133-141.
- Bonetto, A.A. & Castello, H.P. (1985). Pesca y piscicultura en aguas continentales de América Latina. Secretaria general de los Estados Americanos (OEA), Washington D.C., pp. 118.
- Boschi, E.E. & Fuster de Plaza, M.L. (1959). Estudio biológico pesquero del pejerrey del embalse del Río Tercero (*Basilichthys bonariensis*). Departamento de Investigaciones Pesqueras, Secretaria de Agricultura y Ganaderia. Buenos Aires, Pub. Nro 8. pp. 61.

-
- 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: Receptors localization, intracellular calcium, and gonadotrophin and GH release. *J Endocrinol* 152, 437-446.
- 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). *P Natl Acad Sci USA* 69, 278-282.
- Calvo, J. & Morriconi, E. (1974). Citología adenohipofisaria del pejerrey (*Basilichthys bonariensis*). Ser. Inf. C.I.C. (Prov. de Buenos Aires, Argentina), 11, 1-10.
- Cambré, M. L., Verdonck, W., Ollevier, F., Vandesande, F., Batten, T. F. C., & Kuhn, E. R. (1986). Immunocytochemical identification and localization of the different cell types in the pituitary of the seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Comp Endocrinol* 61, 368-375.
- Carolsfeld, J., Powell, J.F.F, Park, M., Fischer, W.H., Craig, A.G., Chang, J.P., Rivier, J.E., and Sherwood, N.M. (2000). A novel form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in herring sheds light on evolutionary pressures. En prensa.
- Cavari, B., Noso, T., & Kawauchi, H. (1995). Somatolactin, a novel pituitary protein: Isolation and characterization from *Spaurus aurata*. *Mol Mar Biol Biotechnol* 4, 117-122.

-
- Chamson-Reig, A., Lux-Lantos, V.A.R., Tesone, M. & Libertun, C. (1997). GnRH receptors and GnRH endocrine effects on luteoma cells. *Endocrine* 6, 165-171.
- 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.
- Cheng, K.W., Chan, Y.H., Chen, Y.D., Yu, K.L., and Chan, K.M. (1997). Sequence of a cDNA clone encoding a novel somatolactin in goldfish, *Carassius auratus*. *Biochem Bioph Res C* 232, 282-287.
- Clayton, R.N., Harwood, J.P. & Catt, J.K. (1979). Gonadotropin-releasing hormone analogs binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature* 282:90-92.
- Chiba, A., Sohn, Y.C., and Honma, 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, 137-148.
- Cook, H., Berkenbosch, J.W., Fernhout, M.J., Yu, K.L., Peter, R.E., Chang, J.P. & Rivier, J.E. (1991). Demonstration of gonadotropin-releasing hormone receptors on gonadotrophs and somatotrophs of the goldfish: an electron microscope study. *Regul Peptides* 36, 369-378.

-
- Copeland, P.A. & Thomas, P. (1993). Isolation of gonadotropins subunits and evidence for two distinct gonadotropins in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Gen Comp Endocrinol* 91, 115-125.
- Del Valle, A. (1991). Cría de pejerrey en Japón. Informe técnico. JICA (Agencia de cooperación internacional de Japón).
- Dores, R.M., Hoffman, N.E., Chilcutt-Ruth, T, Lancha, A., Brown, C., Marra, L., & Youson, J. (1996). A comparative analysis of somatolactin-related immunoreactivity in the pituitaries of four neopterygian fishes and one chondrosteian fish: an immunohistochemical study. *Gen Comp Endocrinol* 102,1, 79-87.
- Ekengren, B., Peute, J., & Fridberg, G. (1978). Gonadotropic cells in the Atlantic salmon, *Salmo salar*: An experimental, immunocytological, and electron microscopical study. *Cell Tissue Res.* 191, 187-203.
- Elizur, A., Zmora, N., Rosenfeld, H. Meiri, I., Hassin, S., Gordin, H., & Zohar, Y. (1996). Gonadotropins β -GtH I and β -GtH II from the gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen Comp Endocrinol* 102, 39-46.
- Follénus, E., & Dubois, M.P. (1980). localization of anti-ACTH, anti-MSH, and anti- α endorphin reactive sites in the fish pituitary. En "Synthesis and Release of Adenohypophyseal Hormones". Editado por M. Jutisz & K.W. McKerns, pp. 197-208. Plenum, New York.

-
- Fradinger, E.A., von Schalburg, K., & Sherwood, N.M. (2000). An evolutionary perspective on GnRH in fish. Proceedings of the 6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Editado por B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson & S.O. Stefansson. pp 35-38.
- Fridberg, G., Lindahl, K. and Ekengren, B. (1981). The thyrotropic cell in the Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Acta Zool-Stockholm* 62, 43-51.
- García-Hernández, M.P., García-Ayala, A., Elbal, M.T., & Agulleiro, B. (1996). The adenohipophysis of mediterranean yellowtail *Seriola dumerilii* (Risso, 1810): an immunocytochemical study. *Tissue Cell* 28 (5) 577-585.
- García-Hernández, M.P, Koide, Y., Diaz, M.V., & Kawauchi, H. (1997). Isolation of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* Risso, 1810. *Gen Comp Endocrinol* 106, 389-399.
- Hassin, S., Elizur, A., & Zohar, Y. (1995). Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotropin I and II subunits. *J Mol Endocrinol* 15, 23-35.
- Heiser, N. (1993). Acid-base regulation in response to changes of the enviromental: Characteristics and capacity. En "Fish Ecophysiology". Editado por J.C. Rankin and F.B. Jensen, Chapman & Hall, London, pp. 207-230..
- Holloway, A.C.& Leatherland, J.F. (1997). The effects of *N*-Methyl-D,L-aspartate and gonadotropin-releasing hormone on *in vitro* growth hormone release in steroid-primed immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 107, 32-43.

-
- Iraqi, F., Gong, Z., Hew, C.L., & Crim, L. (1993). Isolation and characterization of somatolactin genes from two cold water marine teleost, lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) and halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Mol Mar Biol Biotechnol* 2, 96-103.
- Jackson, K., Goldberg, D., Ofir, M., Abraham, M., & Degani, G. (2000). Cloning, sequencing of β GtH-I, β GtH-II and growth hormone cDNA of the blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) and their expression during the different stages of oogenesis. Proceedings of the 6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Editado por B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson & S.O. Stefansson. pp. 489
- Johnson, L.L., Norberg, B. Willis, M.L. Zebroski, H. & Swanson, P. (1997). Isolation, characterization, and radioimmunoassay of atlantic halibut somatolactin and plasma levels during stress and reproduction in flatfish. *Gen Comp Endocrinol* 105, 194-209.
- Kah, O.P., Brenton, J.G., Dulka, J., Nuñez-Rodríguez, 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 Tissue Res* 244:327-337.
- Kakizawa, S. Kaneko, T., Hasegawa, S., and Hirano, T. (1993). Activation of somatolactin cells in the pituitary of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by low environmental calcium. *Gen Comp Endocrinol* 91, 298-306.

-
- Kakizawa, S., Kaneko, T., Hasegawa, S., and Hirano, T. (1995a). Effects of feeding, fasting, background adaptation, acute stress, and exhaustive exercise on the plasma somatolactin concentrations in rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 98, 137-146.
- Kakizawa, S., Kaneko, T., Ogasawara, T. & Hirano, T. (1995b). Ghanges in plasma somatolactin levels during spawning migration of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Fish Physiol Biochem* 14, 93-101.
- Kakizawa, S., Kaneko, T., and Hirano, T. (1996). Elevation of plasma somatolactin concentrations during acidosis in rainbow trout. *J Exp Biol* 199, 1043-1051.
- Kakizawa, S., Kaneko, T. & Hirano, T. (1997). Effects of hypothalamic factors on somatolactin secretion from the organ-cultured pituitary of raibow trout. *Gen Comp Endocrinol* 105, 71-78.
- Kaneko, T., Kakizawa, S., Yada, T., & Hirano, T. (1993a). Gene expression and intracellular localization of somatolactin in the pituitary of rainbow trout. *Cell Tissue Res* 272, 11-16.
- Kaneko, T., Kakizawa, S., and Yada, T (1993b). Pituitary of “cobalt” variant of the rainbow trout removed from the hypothalamus lacks most of the pars intermedia and neurohypophysial tissue. *Gen Comp Endocrinol* 92, 31-40.
- Kaneko, T. (1996). Cell biology of somatolactin. *Int Rev Cytol* 169, 1-24.
- Kardong, K.V. (1995). Vertebrates comparative: Anatomy, function and evolution. Editado por Brown publishers, 777 pp.

-
- Koide, Y., Noso, T., Schouten, G., Peute, J., Zandbergen, M.A., Bogerd, J., Schulz, R.W., Kawauchi, H., & Goos, J.J.Th. (1992) Maturational gonadotropin from the Atlantic catfish, *Clarias gariepinus*: Purification, characterization localization, and biological activity. *Gen Comp Endocrinol* 87, 327-341.
- Koide, Y., Ioth, H., & Kawauchi, H. (1993). Isolation and characterization of two distinct gonadotropins, GtH I and GtH II , from the binito (*Katsuwonus plelamis*) pituitary glands. *Int J Pept Prot Res* 41, 52-65.
- 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 Physiol Biochem* 11, 219-232.
- Le Provost, F., Leroux, C., Martin, P., Gaye, P., & Djiane, J. (1994). Prolactin gene expression in ovine and caprine mammary gland. *Neuroendocrinology* 60, 305-313.
- Lin, Y.W.P., Rupnow, B.A., Price, D.A., Greenberg, R.M., & Wallace, R.A. (1992). *Fundulus heteroclitus* gonadotropins. Cloning and sequencing of gonadotropic hormone (GtH) I and II β -subunits using the polymerase chain reaction. *Mol Cell Endocrinol* 85, 127-139.
- 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.

- Lo, T.B., Huang, F.L., Lin, C.S., Chang, Y.S., & Huang, C.J. (1991). *Bull Inst Zool Acad Sin Monog* 16, 19-38.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Lu, M., Swanson, P. & Renfro, L. (1995). Effect of somatolactin and related hormones on phosphate transport by flounder renal tubule primary cultures. *Am J Physiol* 268 37, R 577- R 582.
- Lytras, A., Quan, N., Vrontakis, M.E., Shaw, J.E., Cattini, P.A., & Friesen, H.G. (1993). Growth hormone expression in human Burkitt lymphoma serum-free Ramos cell line. *Endocrinology* 132, 620-628.
- Marchant, T.A. & Peter, R.E. (1986). Seasonal variation in body growth rates and circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Exp Zool* 237: 231-239.
- 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.
- Margolis-Kazan, H. & Schreibman, M.P. (1981). Cross-reactivity between human and fish pituitary hormones as demonstrated by immunocytochemistry. *Cell Tissue Res* 221: 257-267.

-
- 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 Co* 43, 1334-1339.
- Mayer, I. Rand-Weaver, M. & Borg, B. (1998). Effects of gonadectomy and steroids on plasma pituitary levels of somatolactin in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Gen Comp Endocrinol* 109, 223-231.
- Melamed, P., Eliahu, N., Levari-Sivan, B., Ofir, M., Farchi-Pisanti, O., Renteier-Delrube, F., Smal, J., Yaron, Z. & Naor, Z. (1995). Hypotalamic 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 subunits and growth hormone in the teleost fish, tilapia. *Neuroendocrinology* 64, 320-328.
- 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 adenohipophysis of the Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Comp Endocrinol* 73, 270-283.

-
- Mousa, M. & Mousa, S.A. (1999a). Immunocytochemical study on the localization and distribution of the somatolactin cells in the pituitary gland and the brain of *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *Gen Comp Endocrinol* 113, 197-211.
- Mousa, M. & Mousa, S.A. (1999b). Immunocytochemical and histological studies on the hypophyseal-gonadal system in the freshwater Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), during sexual maturation and spawning in different habitats. *J Exp Zool.* 284, 343-354.
- Munro, A.D. (1985). The structure of the adenohipophysis of *Aequidens pulcher* (Teleostei, Cichilidae). I. Histological and immunohistochemical studies. *Gen Comp Endocrinol* 60, 215-226.
- Nelson, J. (1994). Fishes of the world. 3rd Ed. Editado por J. Wiley & Sons, Inc.. New York. pp. 600.
- Nozaki, M.A., Naito, N., Swanson, P., Mijata, K, Nakai, Y., Oota, Y., Suzuki, K., & Kawauchi, H. (1990). Salmonid pituitary gonadotrophs I. Distinct cellular distribution of two gonadotropins, GtH I and GtH II. *Gen Comp Endocrinol* 77, 358-367.
- Nozaki, M.A., Gorbman, A, & Sower, S.A. (1994). Difusion between the neurohypophysis and the adenohipophysis in lampreys, *Petromyzon marinus*. *Gen Comp Endocrinol* 96, 385-391.

- Oguri, M. (1983). Dermal melanophore and renal melanin-containing cells in the "cobalt" variant of rainbow trout. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 49, 1679-1681.
- Okada, T., Kawazoe, I., Kimura, S., Sasamoto, Y., Aida, K., & Kawauchi, H. (1994). Purification and characterization of gonadotropin I and II from pituitary glands of tuna (*Tunmus obesus*). *Int J Pept Prot Res* 42, 69-80.
- Olivereau, M. (1969). Activité de la pars intermedia de l'hypophyse autotransplantée chez l'Anguille. *Z. Zellforsch. Mikros. Anat* 98, 74-87.
- Olivereau, M. (1976). Les cellules gonadotropes hypophysaires du Saumon de l'Atlantique: Unicité ou dualité?. *Gen Comp Endocrinol* 28, 82-95.
- Olivereau, M., Aimar, C., and Olivereau, J.M. (1980). PAS-positive cells of the pars intermedia are calcium sensitive in the goldfish maintained in a hyposmotic milieu. *Cell Tissue Res* 212, 29-38.
- Olivereau, M., Olivereau, J.M, and Aimar, C. (1981a). Specific effect of calcium ions on the calcium-sensitive cells of the pars intermedia in the goldfish. *Cell Tissue Res* 214, 23-31.
- Olivereau, M., Chambolle, P. & Dubourg, P. (1981b). Ultrastructural changes in the calcium sensitive (PAS-positive) cells of the pars intermedia of eels kept in deionized water and in normal and concentrated sea water. *Cell Tissue Res* 219, 9-26.

-
- Olivereau, M. & Olivereau, J.M. (1982a). Calcium sensitive cells of the pars intermedia and osmotic balance in the eel. I. Responses to changes in the environmental calcium and magnesium. *Cell Tissue Res* 222, 231-241.
- Olivereau, M. & Olivereau, J.M. (1982b). Calcium sensitive cells of the pars intermedia and osmotic balance in the eel. II. Responses to calcium-free sea water. *Cell Tissue Res* 225, 487-496.
- Olivereau, M. & Nagahama, Y. (1983). Immunocytochemistry of gonadotropic cells in the pituitary of some teleost species. *Gen Comp Endocrinol* 50, 252-260.
- Olivereau, M. & Rand-Weaver, J.M. (1994a). Immunocytochemical study of the somatolactin cells in the pituitary of Pacific salmon, *Oncorhynchus nerka*, and *O. keta* at some stage of the reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* 93, 28-35.
- Olivereau, M. & Rand-Weaver, J.M. (1994b). Immunoreactive somatolactin cells in the pituitary of young, migrating, spawning and spent chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Fish Physiol Biochem* 13, 141-151.
- O'Neal, K.D., Montgomery, D.W., Truong, T.M., & Yu-Lee, L.Y. (1992). Prolactin gene expression in human thymocytes. *Mol Cell Endocrinol* 87, R19-23.
- Ono, M. & Takayama, Y. (1992). Structures of cDNAs encoding chum salmon pituitary-specific transcription factor, Pit-1/GHF-1. *Gene* 226, 275-279.

-
- Ono, M., Takayama, Y., Rand-Weaver, M., Sakata, S., Yasunaga, T., Nono, T., & Kawauchi, H. (1990). cDNA cloning of somatolactin, a new pituitary protein related to growth hormone and prolactin. *P Natl Acad Sci USA* 87, 4330-4334.
- Ono, M., Harigai, T., Kaneko, T., Sato, Y., Ihara, S., & Kawauchi, H. (1994). Pit-1/GH factor-1 involvement in the gene expression of somatolactin. *Mol Endocrinol* 8, 109-115.
- Parhar, I.S. & Iwata, M. (1994). Gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons project to growth hormone and somatolactin cells in the Steelhead trout. *Histochemistry* 102: 195-203.
- Park, M.K. & Wakabayashi, K. (1986). Preparation of a monoclonal antibody to common aminoacid sequence of LHRH and its application. *Endocrinol Jap* 33, 257-272.
- Pendon, C., Martinez-Barbera, J.P., & Valdivia, M.M. (1994). Cloning of a somatolactin-encoding cDNA from sole (*Solea senegalensis*). *Gene* 147, 227-230.
- Peter, R.E., Yu, K., Marchant, T.A & Rosenblum, P.M. (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
- Peute, J., Goos, H.J.Th., de Bruyn, M.B.A. & Van Oordt, P.G.W.J. (1978). Gonadotropic cells of the rainbow trout pituitary during the annual cycle:

- Ultrastructure and hormone content. *Ann Biol Anim Biochem Biophys* 18, 905-910.
- Planas, J., Swanson, P., Rand-Weaver, M. & Dickhoff, W.W. (1992). Somatolactin stimulates in vitro gonadal steroidogenesis in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen Comp Endocrinol* 87, 1-5.
- Quérat, B. (1994). Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates. Perspectives in Comparative Endocrinology. NRC Canada, Canada. Editado por Davey, K.G., Peter, R.E. & Tobe, S.S. pp. 27-35.
- Quérat, B. (1995). Structure relationships between "fish" and tetrapod gonadotropins. Reproductive Physiology of Fish. Fish Symposium 95, Austin, USA, Editado por Goetz, F.W. & Thomas, P. pp. 7-9.
- Rand-Weaver, M.; Noso, T., Muramoto, K. & Kawauchi, H. (1991a). 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.; Baker, B.J., & Kawauchi, H. (1991b). Cellular localization of somatolactin in the pars intermedia of some teleost fishes. *Cell Tissue Res* 263, 207-215.
- 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. (1993a). Evolution of the structure of the growth hormone and prolactin family. En "The Endocrinology of Growth, Development, and Metabolism in Vertebrates" Editado por M.P. Schereibman, C.G. Scanes, and P.K.T. Pang, pp. 13-42. Academic Press, San Diego.
- Rand-Weaver, M. Pottinger, T.G., and Sumpter, J.P. (1993b). Plasma somatolactin concentrations in salmonid fish are elevated by stress. *J Endocrinol* 138, 509-515.
- Rand-Weaver, M., & Swanson, P. (1993). Plasma somatolactin levels in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during smoltification and sexual maturation. *Fish Physiol Biochem* 11, 175-182.
- Rand-Weaver, M., Pottinger, T.G. & Sumpter, J.P. (1995). Pronounced seasonal rhythms in plasma somatolactin levels in rainbow trout. *J Endocrinol* 146, 113-119.
- 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. pp 467-473.

-
- Safford, S.E. (1992). Purification and chemical and biological characterization of prolactin and somatolactin and partial characterization of growth hormone from two marine teleost, red drum, *Sciaenops ocellatus* and Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*. Ph.D thesis, University of Texas at Austin. Austin, TX.
- Schachter, B.S., Durgerian, S., Harlan, R.E., Pfaff, D.W., & Schivers, B.D. (1984). Prolactin mRNA exists in rat hypothalamus. *Endocrinology* 114, 1947-1949.
- Schreibman, M.P., Leatherland, F.J. & McKeown, B.A. (1973). Functional morphology of the teleost pituitary gland. *Am Zool* 13, 719-742.
- Schreibman, M.P., Holtzman, S. & Cepriano, L. (1990). The life cycle of the brain-pituitary-gonad axis in teleost. "Progress in Comparative Endocrinology". Editado por Epple, A., Scanes, C.G. & Stetson, M.H., Wiley/Liss, New York, pp. 399-408.
- Schulz, R.W., Bogard, J., Bosma, P.T., Peute, J., Rebers, F.E.M., Zandbergen, M.A., & Th Goos, H.J. (1995). Physiological, morphological and molecular aspects of gonadotropins in fish with special reference to the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Proceeding of the 5th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Texas, 1995. Editado por F.W. Goetz & P. Thomas, pp.2-9.
- Siegmund, I., Troncoso, S., Caorsi, C.E., & González, C.B. (1987). Identification and distribution of the cell types in the pituitary gland of *Austromenidia latilavina* (Teleostei, Atherinidae). *Gen Comp Endocrinol* 67, 348-355.

- Simon, N., & Reinboth, R. (1974). Adenohypophyse und hypothalamus. Histophysiologische untersuchungen bei *Lepomis* (Centrarchidae). *Adv Anat Embryol Cell Biol* 48,1-82.
- Sower, S.A. (1998). Brain and pituitary hormones of lampreys, recent findings and their evolutionary significance. *Am Zool* 38, 15-38.
- Stefano, A.V., Canosa, L F., D' Eramo J.L, Fridman, O., Affani, J.M., and Somoza, G.M. (1997). 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. *Comp Biochem Physiol* 118C, 335-345.
- Stefano, A.V. (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. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. pp.124.
- Strüssmann, C.A.(1989). Basic studies on seed production of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Ph.D. thesis, Tokyo University of Fisheries, Tokyo. pp. 351.
- Suzuki, K., Kawauchi, H. & Nagahama. (1987). Biological characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitaries. *Proceeding 1st Congr. Asia and Oceania Soc. Comp. Endocrinol.*, Nagoya. 1987. Editado por E. Ohnishi, Y. Nagahama & H. Ishizaki, pp. 173-174.

-
- Suzuki, K., Kawauchi, H. & Nagahama, Y. (1988a). Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen Comp Endocrinol* 71, 292-301.
- Suzuki, K., Nagahama, Y., & Kawauchi, H. (1988b). Steroidogenic activities of two distinct salmon gonadotropins. *Gen Comp Endocrinol* 71, 452-458.
- Suzuki, K., Kawauchi, H., & Nagahama, Y. (1988c). Isolation and characterization of subunits of two distinct gonadotropins. *Gen Comp Endocrinol* 71, 302-306.
- Swanson, P., Suzuki, K., & Kawauchi, H. (1987). Isolation and biochemical characterization of two distinct gonadotropins from coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Am Zool* 27, 79a.
- Swanson, P. (1991). Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. *Reproductive Physiology of Fish. Fish Symp* 91, Sheffield, UK, Editado por Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. pp. 2-7.
- Tadokoro, N., Koibuchi, N., Ohtake, H., Kawatsu, T., Kato, Y., Yamaoka, S., & Kumasaka, T. (1995). Expression of prolactin gene in human decidua during pregnancy studied by in situ hybridization histochemistry. *Endocr J* 42, 537-543.
- Takayama, Y., Ono, M., Rand-Weaver, M., & Kawauchi, H. (1991a). Greater conservation of somatolactin, a presumed pituitary hormone of the growth hormone/prolactin family, than of growth hormone in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 83, 366-374.

-
- Takayama, Y., Rand-Weaver, M., Kawauchi, H. & Ono, M. (1991b). Gene structure of chum salmon somatolactin, a presumed pituitary hormone of the growth hormone/prolactin family. *Mol Endocrinol* 5, 778-786.
- Tanaka, H., Kagawa, H., Okusawa, K., & Hirose, K. (1993). Purification of gonadotropins (PmGtH I and II) from red seabream (*Pagrus major*) and development of a homologous radioimmunoassay for Pm GtH II. *Fish Physiol Biochem* 10, 409-418.
- Taniyama, S., Kitahashi, T., Ando, H., Ban, M., Ueda, H. and Urano, A. (1999). Changes in the levels of mRNAs for GH/prolactin/somatolactin family and Pit-1/GHF-1 in the pituitaries of pre-spawning chum salmon. *J Mol Endocrinol* 23, 189-198.
- Trudeau, V.L. (1997). Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Reviews of Reproduction*. 2, 55-68.
- 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
- Tsuneki, K. & Gorbman, A. (1975). Ultrastructure of anterior neurohypophysis and the pars distalis of the lamprey, *Lampetra tridentata*. *Gen Comp Endocrinol* 25, 487-508.

-
- Ueda, H. & Hirashima, T. (1979). On two different types of putative gonadotropins in the pituitary gland of the masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Annot Zool Japon* 52, 114-124
- Ueda, H., Young, G. & Nagahama, Y. (1983). Immunocytochemical identification of thyrotropin (TSH)-producing cells in pituitary glands of several species of teleost with antiserum to human TSH β subunits. *Cell Tissue Res* 231, 199-204.
- Van Der Kraak, G., Suzuki, K., Peter, R.E., Itoh, H. & Kawauchi, H. (1992). Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *Gen Comp Endocrinol* 85, 217-229.
- Van Eys, G.J.J.M. (1980). Structural changes in the pars intermedia of the cichlid teleost *Saratherodon mossambicus*. *Gen Comp Endocrinol* 49, 277-285.
- Vissio, P.G., Paz, D.A. & Maggese, M.C. (1996). The adenohipophysis of the swamp eel, *Synbranchus marmoratus*: An immunocytochemical analysis. *Biocell* 20, 155-161.
- Watson, R.E., Wiegand, 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, 121-132.

-
- Wilson, D.M., Emanuele, N.V., Jurgens, J.K., & Kelley, M.R. (1992). Prolactin message in brain and pituitary of adult male rats is identical: PCR cloning and sequencing of hypothalamic prolactin cDNA from intact and hypophysectomized adult male rats. *Endocrinology* 131, 2488-2490.
- Yan, H. Y., and Thomas, P. (1991). Histochemical and immunocytochemical identification of the pituitary cell types in three sciaenid fishes: Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*), Spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) and Red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Gen Comp Endocrinol* 84, 389-400
- Yan, L., Swanson, P. & Dickhoff, W.W. (1992). A two receptor model for salmon gonadotropins (GtH I and GtH II). *Biol Reprod* 47, 418-427.
- Yang, B.Y., Arab, M., & Chen, T.T. (1997). Cloning and characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) somatolactin cDNA and its expression in pituitary and nonpituitary tissues. *Gen Comp Endocrinol* 106, 271-280.
- Zhu, Y. & Thomas, P. (1995). Red drum somatolactin: Development of a homologous radioimmunoassay and plasma levels after exposure to stressors or various backgrounds. *Gen Comp Endocrinol* 99, 275-288.
- Zhu, Y. and Thomas, P. (1996). Elevations of somatolactin in plasma and pituitaries and increased alfa-MSH call activity in red drum exposed to black background and decreased illumination. *Gen Comp Endocrinol* 101, 21-31.
- Zhu, Y. and Thomas, P. (1997). Studies on the physiology of somatolactin secretion in red drum and Atlantic croaker. *Fish Physiol Biochem* 17, 271-278.