

**SISTEMAS GnRH EN PECES PERCIFORMES
DE INTERÉS EN ACUICULTURA**

José Antonio Muñoz Cueto y David González Martínez

Departamento de Biología
Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales
Universidad de Cádiz
Polígono Río San Pedro. 11510 – Puerto Real. Cádiz

1.- LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH)

1.1.- Isoformas de GnRH

Aunque está claramente establecido que el control de la reproducción depende de la interacción de múltiples factores, esta regulación es ejercida principalmente por la hormona liberadora de gonadotrofinas o GnRH (Schally et al., 1971; Figura 1). Como su nombre indica, el decapeptido GnRH constituye el principal factor cerebral implicado en la estimulación de la producción y secreción de las dos gonadotrofinas hipofisarias, FSH y LH (Breton et al., 1972; Sherwood et al., 1993). Además, la GnRH parece estar implicada en la modulación de las conductas sexuales y de anidamiento (Muske y Moore, 1994; Yamamoto et al., 1995; 1997). Así, el esclarecimiento de la organización de estos sistemas GnRH puede aportar valiosas informaciones que favorezcan el conocimiento y el control del ciclo reproductivo.

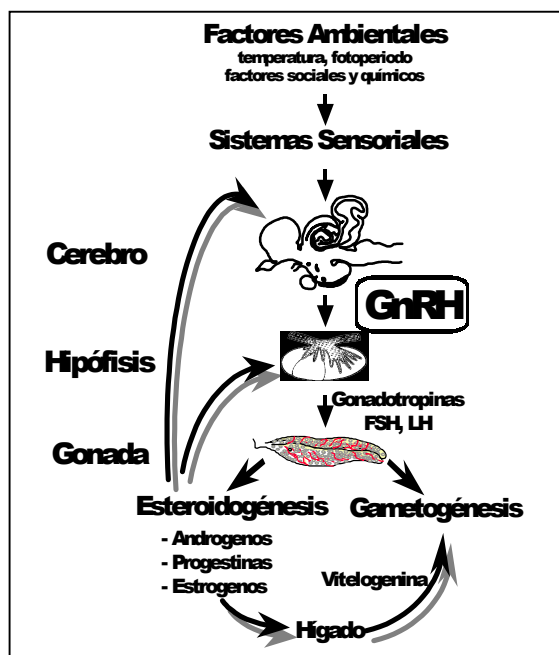


Figura 1.- Eje cerebro-hipófisis-gónada y reproducción. La hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) representa el principal factor neurohormonal en el control de la liberación de gonadotrofinas.

En invertebrados, y es probable que este número siga en aumento (Figura 2). En vertebrados se han descrito: dos GnRHs en un ciclóstomo, la lamprea (IGnRH-I y IGnRH-III; Sower et al., 1993); una GnRH en condriictios, en un tiburón (dfGnRH,

Sin embargo, la GnRH no constituye una única molécula, sino que se corresponde con una familia de decapeptidos que mantienen una elevada conservación estructural (Figura 2). De hecho, desde el descubrimiento en 1971 de la primera forma de GnRH en mamíferos (mGnRH, Matsuo et al., 1971), se ha descrito la existencia de quince isoformas diferentes de GnRH, a las cuales se le ha asignado el nombre de las especies en las cuales han sido evidenciadas por primera vez. Así, en los últimos treinta años se han caracterizado y secuenciado doce isoformas distintas de GnRH en el cerebro de vertebrados, dos en protocordados y una en

| GnRH | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|
| mamífero | pGlu | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Arg | Pro | Gly NH ₂ |
| pollo-I | - | - | - | - | - | - | - | Gln | - | - |
| dorada | - | - | - | - | - | - | - | Ser | - | - |
| cobaya | - | Tyr | - | - | - | - | Val | - | - | - |
| salmon | - | - | - | - | - | - | Trp | Leu | - | - |
| tiburón | - | - | - | - | His | - | - | Asn | - | - |
| arenque | - | - | - | - | His | - | - | Ser | - | - |
| medaka | - | - | - | - | Phe | - | - | Ser | - | - |
| pez-perro | - | - | - | - | His | - | Trp | Leu | - | - |
| pollo-II | - | - | - | - | His | - | Trp | Tyr | - | - |
| lamprea III | - | - | - | - | His | Asp | Trp | Lys | - | - |
| tunicado I | - | - | - | - | Asp | Tyr | Phe | Lys | - | - |
| tunicado II | - | - | - | - | Leu | Cys | His | Ala | - | - |
| lamprea I | - | - | Tyr | - | Leu | Glu | Trp | Lys | - | - |
| pulpo | - | Asn | Tyr | - | Phe | - | Asn | - | Trp | His |

Figura 2.- Secuencias de las distintas isoformas del decapeptido GnRH: doce en vertebrados, dos en protocordados y una en invertebrados

Lovejoy et al., 1992); cinco GnRHs en peces teleósteos, en el salmón (sGnRH, Sherwood et al., 1983), en el pez gato (cfGnRH, Ngamvongchon et al., 1992) en la dorada (sbGnRH, Powell et al., 1994), en el arenque (hrGnRH, Carosfeld et al., 2000) y en medaka (mdGnRH, Okubo et al., 2000); dos formas de GnRH en aves, ambas descritas en el pollo (cGnRH-I, King y Millar, 1982a, Miyamoto et al., 1982; cGnRH-II, King y Millar, 1982b, Miyamoto et al., 1984); y dos GnRHs en mamíferos, puestas de manifiesto en el cerdo (mGnRH; Matsuo et al., 1971; Burgus et al., 1972) y en la cobaya (gpGnRH, Jiménez-Liñán et al., 1997). En protocordados se han descrito dos formas de GnRH en tunicados, tGnRH-I y tGnRH-II (Powell et al., 1996). Recientemente en un invertebrado, el pulpo, también se ha aislado y caracterizado una molécula de 12 aminoácidos con estructura y funciones similares a la GnRH (Iwakoshi et al., 2001). De estas 15 formas de GnRH, hasta 7 de ellas están presentes en el cerebro de peces teleósteos: cGnRH-II, sGnRH, mGnRH, sbGnRH, cfGnRH, hrGnRH y mdGnRH.

1.2.- Síntesis de GnRH

La hormona liberadora de gonadotrofinas se sintetiza en forma de un precursor que recibe el nombre de prepro-GnRH. Además, los genes de las distintas formas de GnRH presentan una estructura muy conservada a lo largo de la filogenia (Adelman et al., 1986; Gothilf et al., 1996). Todos estos genes contienen información que codifica para la síntesis de un péptido señal, el propio decapeptido GnRH, un tripéptido de procesamiento y un péptido asociado a cada GnRH, denominado GAP (Figura 3). Del análisis de su estructura y del estudio de su función, se ha deducido que tras la escisión del péptido señal, el residuo de ácido glutámico del amino terminal de la GnRH se cicla para producir ácido piroglutámico. Entonces el GnRH se separa del GAP al escindir de los aminoácidos dibásicos del sitio de procesamiento (Lys¹²-Arg¹³)



Figura 3.- Organización del cDNA del precursor de GnRH. Este precursor está constituido por un péptido señal, el decapeptido GnRH, un péptido de procesamiento (CAS), y un péptido asociado a la GnRH (GAP).

mediante la acción de endopeptidasas y la carboxipeptidasa E. El grupo carboxi-terminal de la molécula ($\text{Gly}^{10}\text{-Gly}^{11}$) se modifica por acción de la α -peptidil-glicina monooxigenasa, que amida el grupo carboxi terminal ($\text{Gly}^{10}\text{-NH}_2$) del decapeptido ya activo. A continuación, el GnRH y GAP se almacenan en gránulos de secreción hasta ser secretados (Wetsel et al., 1991). Algunos estudios sugieren que el GAP inhibe la secreción de prolactina (Nicolics et al., 1985) y estimula la liberación de gonadotropinas (Millar et al., 1986). No obstante, estas acciones no han sido corroboradas (Seeburg et al., 1989) y actualmente se considera que la función del GAP se limita a péptido de apoyo, y a proporcionar la estructura secundaria adecuada para el procesamiento correcto del precursor de GnRH (Sherwood et al., 1994).

1.3.- Organización de los sistemas GnRH en teleósteos

En peces teleósteos, el patrón básico de distribución de las células GnRH ha sugerido la existencia de dos sistemas principales: un sistema GnRH distribuido a lo largo de la porción ventral del cerebro anterior (nervio terminal, telencéfalo ventral, área preóptica e hipotálamo) y que expresa distintas formas de GnRH según las especies (sGnRH, mGnRH, cfGnRH, sbGnRH, hrGnRH, mdGnRH); y otro sistema GnRH en la transición entre el diencéfalo y el mesencéfalo (sinencéfalo), que expresa de forma conservada cGnRH-II (Goos et al., 1985; Kah et al., 1986; Subheader y Rama Krishna, 1988; Batten et al., 1990; Kah et al., 1991; Yamamoto et al., 1995; Rodríguez-Gómez et al., 1999). La organización de estos sistemas se ha determinado principalmente mediante técnicas inmunohistoquímicas usando anticuerpos más o menos específicos dirigidos contra los propios decapeptidos GnRH. No obstante, existen evidencias de que estos anticuerpos presentan reacción como consecuencia de la alta homología existente entre los distintos decapeptidos (60-90%).

En la lubina, estudios previos basados en el uso de anticuerpos contra la forma sGnRH mostraron la existencia de numerosas neuronas GnRH a lo largo de una continuidad de fibras que se extendían desde los bulbos olfativos hasta la hipófisis (Kah et al., 1991). Sin embargo, estos anticuerpos no pusieron de manifiesto las células GnRH presentes en el sinencéfalo de la lubina (Kah et al., 1991). Estas células si

fueron evidenciadas mediante el uso de anticuerpos contra la forma cGnRH-II, que también reveló la presencia de fibras inmunoteñidas en la hipófisis (J.A. Muñoz-Cueto, observación personal). En otras especies de teleósteos también se ha detectado una inervación de fibras cGnRH-II en la hipófisis (Yu et al., 1988; Schulz et al., 1993; Rodríguez-Gómez et al., 1999).

Recientemente, se ha demostrado que los peces del orden Perciformes expresan tres formas distintas de GnRH en el cerebro: sGnRH, sbGnRH y cGnRH-II (Powell et al., 1994; White et al., 1995; Senthilkumaran et al., 1999). Estas tres formas de GnRH parecen tener una clara acción estimuladora sobre la liberación de gonadotrofinas hipofisarias, siendo más potentes los efectos de las formas cGnRH-II y sGnRH respecto a la forma sbGnRH (Zohar et al., 1995). Sin embargo, la forma sbGnRH presenta unos niveles mucho más elevados en la hipófisis de perciformes, lo que hace pensar que esta isoforma es la que desempeña de forma fisiológica las funciones hipofisiotróficas (Powell et al., 1994; Holland et al., 1998; Rodríguez et al., 2000). Si bien sus funciones no están del todo esclarecidas, las formas sGnRH y cGnRH-II parecen desempeñar acciones neurotransmisoras, neuromoduladoras y/o conductuales (Zohar et al., 1995; Fernald y White, 1999).

Además, los sistemas celulares que expresan estas tres formas de GnRH parecen presentar una clara segregación anatómica en el cerebro (Gothilf et al. 1996; White y Fernald, 1998a). Así, la expresión de la forma sGnRH tiene lugar en los bulbos olfativos; las células del área preóptica expresan la forma sbGnRH; y por último, la forma cGnRH-II se expresa en células del núcleo de fascículo longitudinal medial del sinencéfalo (Gothilf et al., 1996; Parhar, 1997, Ookura et al., 1999).

1.4.- Ontogenia de los sistemas GnRH

Basándose en esta segregación neuroanatómica y funcional, así como en observaciones obtenidas durante el desarrollo ontogénico, se ha propuesto que los tres sistemas GnRH que se expresan en el cerebro de perciformes se originan a partir de distintos primordios embrionarios (Parhar, 1997, Ookura et al., 1999; Chiba et al., 1999). Las neuronas que expresan sGnRH se desarrollarían a partir de la placoda olfativa, mientras que las células sbGnRH y cGnRH-II lo harían desde primordios del área preóptica basal y del mesencéfalo, respectivamente. Sin embargo, en otros vertebrados como los anfibios, aves y mamíferos, todas las células GnRH del cerebro anterior se desarrollan a partir de un mismo primordio en la placoda olfativa, mientras que las células GnRH del cerebro medio se originan a partir de otro primordio en la

zona germinal del tercer ventrículo (Schwanzel-Fukuda y Pfaff, 1989; Muske y Moore, 1990; Murakami et al., 1991,1992; Akutsu et al., 1992). En estos vertebrados, las neuronas GnRH del cerebro anterior migran rostro-caudalmente desde la placoda olfativa y adoptan posiciones finales desde los bulbos olfativos hasta la región hipotalámica. Además de tener distintos orígenes embrionarios, las neuronas GnRH del cerebro anterior y del sinencéfalo parecen mostrar diferencias en el patrón temporal de expresión durante el desarrollo. Así, estudios inmunocitoquímicos llevados a cabo en la rana toro, han puesto de manifiesto que las células GnRH del cerebro medio expresan antes que las células del cerebro anterior (Muske y Moore, 1990). Sin embargo, en la musaraña, el patrón de expresión es inverso, ya que las células GnRH del cerebro anterior son de expresión más temprana (Gill et al., 1995).

En primates, también se ha descrito la existencia de dos poblaciones distintas de células GnRH en el cerebro anterior, ambas originadas en la placoda olfativa, pero que difieren en el momento de iniciar su expresión (Quanbeck et al., 1997). Estas células GnRH, que reciben el nombre de células "tempranas" y células "tardías", presentan también diferencias en su morfología y distribución neuroanatómica: las neuronas GnRH "tempranas" se extienden hasta la región preóptica mientras que las células GnRH tardías alcanzan el hipotálamo basal (Quanbeck et al., 1997).

1.5.- Los receptores de la hormona liberadora de gonadotrofinas

La hormona liberadora de gonadotrofinas desencadena sus acciones hipofisiotróficas tras unirse a receptores específicos presentes en la membrana de las células gonadotropas adenohipofisarias (Conn, 1994). Si bien estos efectos se pusieron de manifiesto hace más de dos décadas analizando las propiedades de unión de las GnRHs nativas y/o de sus análogos (Marshall et al, 1976), aún hoy desconocemos muchos aspectos sobre la interacción del receptor con su ligando, su regulación fisiológica o su distribución en el cerebro e hipófisis de vertebrados. Así, el análisis de las funciones, la distribución y los mecanismos moleculares que regulan la transcripción de los receptores de GnRH se erigen como aspectos importantes para el conocimiento de los sistemas GnRH (Kaiser et al., 1993; Norwitz et al., 1999).

Estos receptores de GnRH pertenecen a una superfamilia de receptores acoplados a la proteína G y poseen una sola cadena polipeptídica con siete dominios transmembrana hidrofóbicos separados por giros hidrófilos extra e intra-celulares de extensión variable (Coburnous, 1992; Figura 4). En mamíferos, la estructura del receptor de GnRH es característica debido a la ausencia del dominio intracelular

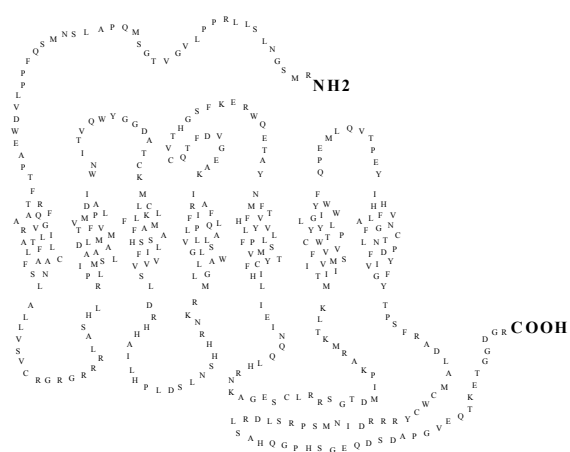


Figura 4.- Estructura característica del receptor de GnRH.

Aunque los primeros receptores de GnRH se pusieron de manifiesto en la hipófisis, hoy resulta evidente que también se expresan en tejidos extrahipofisarios y, especialmente, en el cerebro y las gónadas, reforzando la idea de que estos deca péptidos no sólo ejercen acciones neuroendocrinas a nivel de la hipófisis, sino que pueden actuar como neurotransmisores y/o neuromoduladores en el cerebro, y como factores paracrinos en las gónadas (Marshall et al., 1976; Habibi et al., 1987; Yu et al., 1998). Así, en mamíferos la presencia de sitios de unión a GnRH y/o receptores de GnRH ha sido descrita en la hipófisis (Marshall et al., 1976), cerebro (Marshall et al., 1976; Jennes y Conn, 1994), gónada (Hsueh y Schaeffer, 1985; Kogo et al., 1995; Bull et al., 2000), placenta (Currie et al., 1981; Wolfahrt et al., 1998), timo (Marchetti et al., 1989), plasma (Chan y Chaplin, 1985), hígado, músculo cardíaco, bazo, pulmón (Marshall et al., 1976) o vesícula gástrica (Huang et al., 2001). En ciclóstomos y peces existen receptores de alta afinidad para la GnRH en la hipófisis (Habibi et al., 1987; Crim et al., 1988; Andersson et al., 1989; Habibi y Peter, 1991; Weil et al., 1992; Pagelson y Zohar, 1992; Knox et al., 1994; Yu et al., 1998), y de forma particular en las células gonadotropas y somatotropas (Cook et al., 1991), pero también en tejidos extrahipofisarios como el cerebro, gónada, hígado y riñón (Patti y Habibi, 1993; Habibi y Pati, 1993; Yu et al., 1998).

El notable desarrollo de las técnicas moleculares permitió, al inicio de los años noventa, la clonación, secuenciación y expresión del primer receptor de GnRH en humanos (Kakar et al., 1992; Sealfon et al., 1997). Posteriormente, se han clonado los cDNAs de diversos receptores funcionales de GnRH en otras especies de mamíferos (Tsutsumi et al., 1992; Reinhart et al., 1992). En los últimos años, también se han

(Sealfon et al., 1997). La interacción de la GnRH con su receptor desencadena una cascada de reacciones intracelulares que se inicia con la activación de la proteína G, y conduce a la producción de segundos mensajeros del tipo del fosfatidil inositol, que estimulan la síntesis y secreción de las gonadotropinas FSH y LH.

Aunque los primeros receptores de GnRH se

clonado y caracterizado los cDNAs de distintos receptores de GnRH presentes en peces tales como el barbo (Tensen et al., 1997), la carpa dorada (Illing et al., 1999), la lubina americana (Alok et al., 2000), la trucha arco iris (Madigou et al., 2000) o *Haplochromis burtoni* (Robison et al., 2001). La disponibilidad de estas herramientas moleculares ha permitido localizar las células que expresan estos receptores de GnRH en el cerebro y la hipófisis mediante técnicas de hibridación *in situ* (Eidne et al., 1992; Jennes et al., 1994; Troskie et al., 2000; Madigou et al., 2000). Estudios recientes han puesto de manifiesto que al igual que se expresan 3 formas distintas de GnRH, en algunos vertebrados también se expresan al menos 3 receptores de GnRH diferentes (Troskie et al., 1998; Troskie et al., 2000; Wang et al., 2001). Estos descubrimientos sugieren que ha existido una evolución conjunta de las GnRHs y sus receptores, y que posiblemente, existe una especialización funcional y topográfica en el establecimiento de sus interacciones.

Diferentes estudios han mostrado la existencia de variaciones en el número de receptores de GnRH hipofisarios a lo largo del ciclo reproductivo (Habibi y Peter, 1991). Asimismo, la capacidad y/o expresión de los receptores de GnRH puede verse alterada por el entorno endocrino, y en concreto por la gonadectomía (Marian et al., 1981), el tratamiento con GnRH (Omeljaniuk et al., 1989; Kaiser et al., 1993), dopamina (De Leeuw et al., 1988; De Leeuw et al., 1989) y esteroides gonadales (Trudeau et al., 1993; Seong et al., 1998). Estos aspectos serán discutidos posteriormente.

2.- SISTEMAS GnRH EN PERCIFORMES: UN ANÁLISIS COMPARATIVO

2.1.- Antecedentes

En los últimos años, en el marco de un proyecto europeo en el que los autores han participado, se han clonado los cDNAs completos que codifican para las tres formas de GnRH presentes en el cerebro de la lubina, sGnRH, sbGnRH y cGnRH-II (Zmora et al., en prensa), proporcionando información precisa sobre la estructura molecular de cada precursor (preproGnRH) en esta especie. Como en otros casos, el cDNA de estos precursores contiene secuencias que codifican para la síntesis de un péptido señal, el decapeptido GnRH, un tripéptido de procesamiento y un péptido asociado a la GnRH o GAP. Estas secuencias GAP representan herramientas muy valiosas para estudios de hibridación *in situ*, ya que permiten generar ribosondas más largas y con una menor homología en relación con las secuencias que codifican para los propios decapeptidos GnRH (Figura 5).

```

sGAPcDNA 1 GGG AAGAGAAGUGUGGGAGAGCUA----GAGGCA--
--ACCAUCAGGAUGAUGGGUACAGGAGAAGUGGUGUCUCUCCUGAA
GAGGC---GAGUGCCCA-A-ACCCAAGAGAGACUUAGACCAUACA-
AUGUAAUUAUGAUGAUUCCAGUCAUUUUGACCGAAAAAAGAGGUUC
CCU----AACAAAUGA 174

sbGAPcDNA 1 GGG AAGAGGGA-ACUGGACGGCCUCUCCGAGACAC
CAAUCAGAUAGUCGGGAGCUUCCACACGUGGCGACGCCUUCGAGAG
UUUUAGGUUGUGCAGAGGAAUACCCUUUCCCAAAUAUACAGAAUG
AAAGGAUUCUUGACGCAGUCACUGACAGGGAGAACGGAAAUCGAAC
UUACAAGAAAUGA 192

cII GAPcDNA 1 GGCAAGAGGGA-GCUGGACU-CUU----UUGGCA
-----CUUCAGAGAUUUCGGAGGAG AUUAAGCUGUGUGAGG-CAG
GAGAAUGC---AGCUAUUUG-AGACCCAGAGGAG----GAGUGUUC
-----UGAGAAAU-AUCAUUCUGGAUGCCUAGCC-AGAGAGCUCC
AGAAG----AGGAAGUGA 159

```

Figura 5.- Secuencias nucleotídicas de las regiones que codifican los distintos péptidos asociados a cada GnRH (GAP) en la lubina: sGAP, sbGAP y cII GAP. Estas secuencias fueron usadas para la síntesis de ribosondas específicas.

Previamente, se ha puesto de manifiesto que la distribución cerebral de las células inmunoreactivas para cada GnRH coincide con la distribución de las células inmunoreactivas para su GAP asociado (Ronchi et al., 1992; Polkowska y Przekop, 1993). Por ello, y con objeto de evitar los problemas de reactividad cruzada asociada al uso de anticuerpos contra los decapeptidos GnRH, en el

marco de este mismo proyecto europeo se han generado anticuerpos específicos contra péptidos recombinantes de cada GAP, anti-sGAP, anti-sbGAP y anti-cII GAP. Asimismo, se ha llevado a cabo la clonación del receptor de GnRH en la lubina (T. Madigou, E. Mañanós, O. Kah, en preparación), y hemos desarrollado en nuestro laboratorio atlas citoarquitectónicos del cerebro de la lubina a lo largo del desarrollo (D. González-Martínez y J.A. Muñoz Cueto, en preparación) y en individuos adultos (Cerdá-Reverter et al., 2001a, 2001b). Todas estas herramientas moleculares y neuroanatómicas han proporcionado el soporte metodológico y científico necesario para profundizar en el conocimiento de los sistemas GnRH que se expresan en el cerebro de la lubina (sGnRH, sbGnRH y cGnRH-II) y esclarecer las funciones de las distintas formas de GnRH en el control del ciclo reproductivo y de otros procesos fisiológicos.

Para ello, en nuestro laboratorio hemos realizado una serie de estudios encaminados a determinar:

- 1.- la localización precisa de los distintos sistemas GnRH (sGnRH, sbGnRH y cGnRH-II) en el cerebro y la hipófisis de lubinas adultas mediante técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica.
- 2.- la expresión de los distintos sistemas GnRH (sGnRH, sbGnRH y cGnRH-II) en el cerebro y la hipófisis durante el desarrollo ontogénico de la lubina mediante técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica.

3.- la localización de receptores y sitios de unión a GnRH en el cerebro, hipófisis y tejidos somáticos de la lubina y la dorada mediante técnicas de hibridación *in situ* y autorradiografía.

2.2.- Localización de los sistemas GnRH en cerebro e hipófisis de lubinas adultas

En primer lugar, abordamos la localización de las células que expresan cada una de las tres formas de GnRH presentes en el cerebro de la lubina, *Dicentrarchus labrax*, usando ribosondas y anticuerpos específicos dirigidos contra los péptidos asociados a cada GnRH (GAP): GAP de salmón (sGAP), GAP de dorada (sbGAP) y GAP-II de pollo. Los resultados obtenidos demostraron que, en la lubina, cada GAP y su correspondiente decapeptido GnRH se co-expresaban en las mismas células, como había sido descrito previamente en mamíferos (Ronchi et al., 1992; Polkowska y Przekop, 1993). Estos resultados confirman la utilidad de estas herramientas para localizar de forma específica los distintos sistemas GnRH, soslayando los problemas de reactividad cruzada de las ribosondas y anticuerpos generados contra los propios decapeptidos GnRH. Los resultados obtenidos acerca de la distribución cerebral precisa de las células que expresan las formas sGnRH, sbGnRH y cGnRH-II en la lubina, fueron plenamente coincidentes usando técnicas de hibridación *in situ* y de inmunohistoquímica. Así, las células sGnRH se expresaban predominantemente en los bulbos olfativos; las células que expresaban sbGnRH se localizaron principalmente en el telencéfalo ventral y el área preóptica; y las células cGnRH-II se circunscribían al sinencéfalo dorsal (González-Martínez et al., 2001, González-Martínez, en revisión). Resultados similares se han descrito en otras especies de peces perciformes (Powell et al., 1994; White et al., 1995; Gothilf et al., 1996). Sin embargo, en este estudio también demostramos, por primera vez en peces perciformes, la colocalización de las formas sGnRH y sbGnRH en distintas áreas del cerebro anterior y, en concreto, en el bulbo olfativo, el telencéfalo ventral y el área preóptica. Este solapamiento en la expresión no fue consecuencia de la reactividad cruzada de las ribosondas o anticuerpos utilizados, ya que las secuencias de nucleótidos y aminoácidos contra los que iban dirigidos tenían un porcentaje de identidad reducido y los controles llevados a cabo atestiguaban la especificidad de las reacciones. Además, aunque esta coexpresión tenía lugar en las mismas áreas cerebrales, las formas sGnRH y sbGnRH no se coexpresaban en las mismas células. Por ejemplo, las células que expresaban sbGnRH en los bulbos olfativos eran más pequeñas y aparecían más débilmente inmunotendidas que aquellas que expresaban la forma sGnRH en la misma zona. Además, en el hipotálamo se detectaron exclusivamente células sbGnRH y no aparecían células sGnRH.

La especificidad de los anticuerpos utilizados también fue corroborada mediante análisis de Dot-Blot, utilizando como antígenos los péptidos GAPs recombinantes frente a los cuales se generaron los anticuerpos.

Este solapamiento en la distribución de las células sGnRH y sbGnRH en el cerebro anterior de la lubina, observado tanto con hibridación *in situ* como por inmunohistoquímica (González-Martínez et al., 2001; González-Martínez; en revisión), está en discrepancia con estudios previos en perciformes, que muestran una clara segregación neuroanatómica de los distintos sistemas de GnRH: las células sGnRH se distribuyen en los bulbos olfativos y la región del nervio terminal, las células sbGnRH en el área preóptica, y las células cGnRH-II en el núcleo del fascículo longitudinal medial (White et al., 1995; Gothilf et al., 1996; Okuzawa et al., 1997; White y Fernald, 1998a; Parhar et al., 1998). En la lubina, existe un gradiente inverso en la expresión de las formas sGnRH y sbGnRH en el cerebro anterior. Así, la expresión y el número de células sGnRH era mayor en el bulbo olfativo que en el telencéfalo ventral o el área preóptica, y a la inversa, la expresión y el número de células sbGnRH era mayor en el área preóptica que en la región olfativa. De esta forma, las células sGnRH del área preóptica y las células sbGnRH de los bulbos olfativos resultaban poco evidentes, y en la mayoría de los casos eran sólo visibles en una o dos secciones histológicas consecutivas, lo que dificulta su identificación. Por ello, resulta posible que estas células sGnRH del área preóptica y las células sbGnRH de los bulbos olfativos también estén presentes en el cerebro de otros perciformes pero aún no han sido puestas de manifiesto.

Además, en nuestro laboratorio hemos obtenido por primera vez en vertebrados, una información detallada e inequívoca sobre la distribución de las fibras inmunoreactivas para tres formas distintas de GnRH expresadas en el cerebro de un organismo, utilizando anticuerpos específicos contra las distintas GAPs. Esta información puede contribuir de manera relevante al esclarecimiento de las funciones precisas de estas distintas formas de GnRH. Así, las fibras sGnRH-GAP se observaron principalmente en el cerebro anterior (bulbos olfativos, telencéfalo ventral, área preóptica periventricular, hipotálamo, tálamo ventral, área pretectal), aunque también se observó una importante inervación sGnRH-GAP en el tegmento dorsal, techo óptico y rombencéfalo ventral. A su vez, las fibras sbGnRH-GAP sólo fueron evidentes en la superficie ventral del cerebro anterior, asociadas al telencéfalo ventral, área preóptica e hipotálamo, y discurriendo hacia la hipófisis. En cambio, los axones cGnRH-II-GAP estaban distribuidos por todo el cerebro de la lubina, siendo especialmente relevantes en el telencéfalo dorsal y ventral, área preóptica e hipotálamo periventricular, tálamo,

área pretectal, tubérculo posterior, techo y tegmento del mesencéfalo, cerebelo, y rombencéfalo. Ciertos autores han propuesto que la forma sGnRH podría estar implicada en la coordinación de los sistemas sensoriales y motivacionales, que la forma cGnRH-II podría modular la actividad motora en el contexto de la reproducción, mientras que la forma sbGnRH estaría especializada en la liberación de gonadotrofinas hipofisarias (White et al., 1995). En este contexto, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio podrían apoyar estas consideraciones, ya que las fibras sGAP son muy abundantes en áreas sensoriales visuales y gustativas, las fibras cIIGAP inervan de forma profusa la médula espinal y representan las únicas fibras GnRH presentes en el cerebelo, mientras que los axones sbGAP constituyen la fuente principal de GnRH en la hipófisis de la lubina.

Las fibras sbGnRH llegaban a la pars distal proximal y al borde de la pars intermedia de la adenohipófisis, dónde también se encuentran las células gonadotropas y los receptores de GnRH. Este resultado corrobora las evidencias fisiológicas que muestran el papel preponderante de la forma sbGnRH en la estimulación de la secreción de gonadotrofinas en perciformes (Powell et al., 1994; Zohar et al., 1995; Gothilf et al., 1996, 1997; Yamamoto et al., 1997, Holland et al., 1998, Senthilkumaran et al., 1999; Rodríguez et al., 2000).

Sin embargo, la isoforma sbGnRH no representa la única GnRH hipofisiotrófica en la lubina. Los resultados inmunohistoquímicos demuestran que los axones sGnRH-GAP también alcanzan la hipófisis de la lubina, si bien esta inervación es sensiblemente menor en comparación con la inervación sbGnRH-GAP. Estos resultados están en consonancia con los obtenidos por Rodríguez y colaboradores (2000), que detectaron en la hipófisis de la lubina unos niveles de sGnRH 17 veces más bajos respecto a los niveles de sbGnRH. La presencia de la forma sGnRH en la hipófisis de la lubina podría relacionarse con una regulación directa de esta GnRH sobre la actividad de las células gonadotropas, aunque también es posible que estos efectos se ejerzan sobre otras células adenohipofisarias. Al menos en otras especies de teleosteos, se ha descrito un efecto estimulador de la forma sGnRH sobre la liberación de hormona de crecimiento (Marchant et al., 1989) y prolactina (Weber et al., 1997).

En cambio, no se detectaron fibras cIIGAP en la hipófisis de la lubina, lo que sugiere que el posible papel de la forma cGnRH-II en el control de la reproducción no implica una acción directa de esta hormona sobre las células gonadotropas, al menos en esta especie. En consonancia con nuestros resultados, tampoco se encontraron fibras inmunoreactivas frente a un anticuerpo específico contra la forma cIIGAP en la hipófisis del pez gato (Zandbergen et al., 1995), ni fibras cGnRH-II en la hipófisis de

otras especies de teleósteos a pesar de la presencia de cuerpos celulares cGnRH-II en el sinencéfalo dorsal (Amano et al., 1991; Montero et al., 1994; Millar y King, 1994). Sin embargo, existen evidencias que sugieren una implicación de la forma cGnRH-II en la reproducción. Así, estudios recientes han descrito la expresión de cGnRH-II en las gónadas (Yu et al., 1998; von Schalburg et al., 1999; Nabissi et al., 2000) y un posible papel de esta neurohormona en la conducta sexual (Muske y Moore, 1994; Muske, 1993). Asimismo, las células cGnRH-II parecen sensibles, bien de forma directa o indirecta, a los efectos retroalimentadores de los esteroides sexuales (Montero et al., 1994; Rissman y Li, 1998). No obstante, la presión selectiva sobre la estructura de la cGnRH-II y su sorprendente conservación en la escala filogenética, así como la presencia de una importante inervación cGnRH-II en el cerebro, refuerzan la idea de que, además de su papel en la reproducción, esta neurohormona pudiera tener otras funciones más importantes como neurotransmisor, neuromodulador y/u hormona autocrina/paracrina en tejidos periféricos (White et al., 1998; Yu et al., 1998).

En la lubina, un estudio inmunocitoquímico previo utilizando anticuerpos frente a la forma sGnRH mostró la presencia de fibras varicosas sGnRH-inmunoreactivas que contactaban o circundaban cuerpos celulares y dendritas GnRH-inmunopositivas (Kah et al., 1991). Estas evidencias hacen pensar en la existencia de conexiones entre diferentes grupos celulares GnRH y sugieren una coordinación en la actividad de estas poblaciones neuronales (Kah et al., 1991). Observaciones similares se desprenden de nuestros estudios morfofuncionales, en los que hemos podido comprobar cómo células y fibras sGnRH y sbGnRH coexisten en las mismas áreas del cerebro y parecen establecer contactos. Estos contactos resultan especialmente sugerentes en los bulbos olfativos de la lubina, donde las fibras varicosas sbGAP aparecen rodeando a células ganglionares del nervio terminal, que expresan sGAP. En mamíferos, está bien documentada la presencia de terminales axónicos GnRH haciendo sinapsis en otras células GnRH (Leranth et al., 1985; Witkin y Silverman, 1985; Witkin, 1999). Aunque resultan necesarios estudios ultraestructurales para confirmar la existencia de conexiones sinápticas entre las diferentes células GnRH en el cerebro de la lubina, las evidencias obtenidas en nuestro laboratorio pueden apoyar esta hipótesis. Queda por determinar si tales interacciones representan alguna forma de modular la actividad de otras células GnRH, o de sincronizar las actividades de diferentes poblaciones celulares GnRH. No obstante, el solapamiento en la expresión de las formas sGnRH y sbGnRH en las mismas regiones, incluida el área preóptica, la coexistencia de fibras sGnRH y sbGnRH en la pars distal proximal de la hipófisis de la lubina, y la presumible existencia de interacciones directas entre ambas poblaciones GnRH, sugiere que los

sistemas sGnRH y sbGnRH cooperan íntimamente en la sincronización de distintos eventos relacionados con el desarrollo y/o la reproducción.

2.3.- Desarrollo ontogénico de los sistemas GnRH en el cerebro y la hipófisis de la lubina

El estudio ontogénico llevado a cabo en la lubina tanto por hibridación *in situ* como por inmunohistoquímica, reveló por primera vez en teleósteos, y tal como sugerían los estudios en adultos, que los dos sistemas GnRH del cerebro anterior (sGnRH y sbGnRH) se desarrollaban desde un primordio común en la región olfativa, mientras que las células cGnRH-II se originaban a partir de un primordio sinencefálico. Estos resultados difieren respecto a los obtenidos en la mayoría de los estudios realizados en peces perciformes (Gothilf et al., 1996; Parhar, 1997; Okuzawa et al., 1997; White y Fernald, 1998b; Parhar et al., 1998, Ookura et al., 1999). Como se ha referido anteriormente, estos estudios reflejaban la existencia de una segregación neuroanatómica en la expresión de las células sGnRH, sbGnRH y cGnRH-II, y sugerían que las neuronas sGnRH se diferenciaban a partir de la placoda olfativa, mientras que las células sbGnRH lo hacían desde un primordio del área preóptica. Sin embargo, nuestros resultados están en consonancia con los obtenidos en anfibios, aves y mamíferos, en los que todas las neuronas GnRH del cerebro anterior, que se distribuyen en el adulto desde los bulbos olfativos hasta el hipotálamo, tienen un origen embrionario común en un primordio de la placoda olfativa (Schwanzel-Fukuda y Pfaff, 1989; Wray et al., 1989; Murakami et al., 1992; Muske, 1993; Muske y Moore, 1994a,b; Norgren y Gao, 1994; Schwanzel-Fukuda., 1999). El nervio terminal parece desarrollar un papel decisivo en el establecimiento de estas rutas migratorias que guían a las neuronas GnRH desde el primordio olfativo hacia posiciones más caudales en el cerebro anterior (Schwanzel-Fukuda y Pfaff, 1989). En este sentido, resulta interesante reflejar que las células que expresan sbGnRH en la lubina, tanto en individuos adultos como en desarrollo, se extienden desde el bulbo olfativo hasta el hipotálamo, a través del telencéfalo ventral, siguiendo el curso de las fibras del nervio terminal. Además, resulta poco probable que las células sbGnRH de la lubina se originen en un primordio del área preóptica, porque eso significaría que siguen dos cursos migratorios opuestos: un curso rostral hacia el telencéfalo ventral y el bulbo olfativo, y un curso caudal hacia el hipotálamo ventrolateral. Además, en el caso de que las células sbGnRH de la lubina estuviesen originadas en un primordio preóptico, como se ha propuesto en otros perciformes (Parhar, 1997; Okuzawa et al., 1997, Parhar et al., 1998), sería de esperar la presencia de células que expresasen sbGnRH en el área preóptica a los 26-30 días

después de la eclosión, cuando aparecen las primeras células positivas sbGnRH en la región olfativa. Sin embargo, las primeras células sbGnRH localizadas en el área preóptica no se detectaron hasta el día 45 después de la eclosión y la expresión ontogénica indica una clara secuencia rostro-caudal en el curso de estas células.

La expresión de las células sGnRH en la lubina precede a la expresión de las células sbGnRH, de forma que las primeras resultan ya evidentes a los 7 días después de la eclosión, mientras que las segundas no se detectan hasta el día 26-30 tras la eclosión. Así, la expresión de ARNm del precursor de sGnRH es aparente al principio del curso migratorio de estas células, en la propia placoda olfativa, y en el nervio olfativo, por lo que se podrían considerar células de expresión temprana. En cambio, las células sbGnRH permanecen silentes, migran con posterioridad y/o expresan en menor medida durante las primeras etapas de su recorrido desde el primordio olfativo, representando células de expresión más tardía. Curiosamente, estas observaciones coinciden con resultados obtenidos en primates, mediante técnicas inmunocitoquímicas (Quanbeck et al., 1997). En este estudio llevado a cabo en el mono rhesus, se puso de manifiesto la existencia de dos poblaciones de células GnRH que migraban desde la placoda olfativa, llamadas células "tempranas" y "tardías", porque presentaban patrones de expresión temporal de GnRH distintos, así como diferentes morfologías y distribuciones neuroanatómicas. Las neuronas GnRH tempranas se extendían hasta la región preóptica y las células GnRH tardías alcanzaban el hipotálamo basal (Quanbeck et al., 1997). Estas evidencias sugieren que los sistemas GnRH de grupos tan distantes en la escala filogenética como teleosteos y mamíferos, puedan estar más relacionados de lo que actualmente se considera. En este sentido, estudios recientes llevados a cabo en mamíferos, incluidos los humanos, indican que además de las formas mGnRH y cGnRH-II, éstos expresan una tercera isoforma de GnRH, que parece corresponderse con la forma sGnRH y que está colocalizada en las mismas regiones que las células mGnRH (Lescheid et al., 1997; Montaner et al., 1998, 1999; Urbanski et al., 1999; Yahalom et al., 1999).

Los decapeptidos sGnRH y sbGnRH sólo difieren en los residuos aminoácidos situados en las posiciones 7 y 8. Esta gran homología a nivel de aminoácidos, el origen embrionario común de ambas poblaciones celulares y su colocalización en las mismas áreas del cerebro anterior, así como la naturaleza hipofisiotrófica de ambas formas de GnRH, refuerzan considerablemente la hipótesis de que las isoformas sGnRH y sbGnRH se han originado procesos de duplicación y mutación a partir de un gen ancestral común. Estos procesos de duplicación y mutación que dieron lugar a la aparición de una segunda forma de GnRH en el cerebro anterior, parecen haber

ocurrido con posterioridad al proceso de duplicación génica que separó la forma original del cerebro anterior de la forma sinencefálica, que en todos los vertebrados se corresponde con la forma cGnRH-II, y que representa, por tanto, la forma de GnRH más conservada a lo largo de la escala filogenética. Más tarde, como un carácter apomórfico (derivado evolutivamente) de perciformes, el segundo sistema GnRH del cerebro anterior pudo haber perdido progresivamente sus proyecciones y funciones en el cerebro, especializándose en el control de la secreción de gonadotrofinas y del proceso reproductivo. Como dijimos anteriormente, durante la ontogenia de la lubina, la forma sbGnRH representa la GnRH de aparición más tardía, ya que no se detecta la expresión de su ARNm o del péptido hasta el día 26-30 después de la eclosión. En la lubina, las primeras células primordiales de la gónada no son visibles hasta la cuarta semana, los primeros indicios de la cresta genital no se observan hasta el día 43 después de la eclosión y la gónada permanece indiferenciada hasta los 11 meses (Roblin y Brusle, 1983). Además, las células gonadotropas no resultan evidentes en la hipófisis de la lubina durante los primeros 26 días después de la eclosión (Cambré et al., 1990). Por tanto, esta expresión retardada de la forma sbGnRH sugiere que las funciones de esta neurohormona no son demasiado relevantes en el desarrollo temprano, aunque si parecen serlo en la organización y establecimiento del eje cerebro-hipófisis-gónada y del sistema reproductivo. En cambio, la forma sGnRH parece desempeñar un importante papel neuromodulador durante el desarrollo del sistema nervioso y de los sistemas neuroendocrinos ya que su expresión en la lubina se inicia en fases muy tempranas. Así, las células de prolactina empiezan a ser detectables en la hipófisis de la lubina entre los días 9 y 15 después de la eclosión (Cambré et al., 1990), dos días después de que las primeras células sGnRH comiencen su expresión, según los resultados ontogénicos que hemos obtenido. Curiosamente, la forma sGnRH constituye un factor liberador de la secreción de prolactina en *Oreochromis mossambicus*, otro teleosteo perciforme (Weber et al., 1997).

De acuerdo con las evidencias obtenidas en peces, anfibios, aves y mamíferos (Mikami et al., 1988; Muske y Moore, 1990; Muske, 1993; Dellovade et al., 1993; Northcutt y Muske, 1994; Kasten, 1996; Parhar, 1997; Parhar et al., 1998; Ookura et al., 1999), las células cGnRH-II de la lubina, no tienen su origen embrionario en la placoda olfativa sino en la zona germinal del tercer ventrículo, en la transición entre el diencéfalo y el mesencéfalo. Como se comentó anteriormente, se ha sugerido que esta forma de GnRH no está implicada tanto en el control de la reproducción como en funciones neuromoduladoras y/o neurotransmisoras. En este contexto, nuestros estudios ontogénicos revelan que la expresión de cGnRH-II se da en etapas tempranas

del desarrollo, 4 días después de la eclosión, mucho antes de la diferenciación de las células gonadotropas y de la gónadas (Roblin y Brusle, 1983; Cambré et al., 1990) y del establecimiento de un eje cerebro-hipófisis-gónada funcional. Asimismo, la invasión de fibras cGnRH-II, que resulta muy abundante en el cerebro de la lubina, se establece muy pronto durante el desarrollo ontogénico.

3.- RECEPTORES DE GnRH EN PERCIFORMES

La expresión de al menos tres formas de GnRH en una misma especie se asoció inmediatamente a la posible existencia de múltiples receptores de GnRH. Recientemente, se ha puesto de manifiesto que en la carpa dorada se expresan dos subtipos diferentes de receptor de GnRH (Illing et al., 1999), y en varias clases vertebrados parecen expresarse tres receptores distintos de GnRH (Troskie et al., 1998; Wang et al., 2001). La discriminación de la potencia relativa de las distintas formas de GnRH en la inducción de la secreción de gonadotrofinas representa una valiosa información para entender la función de cada isoforma. No obstante, el conocimiento de la distribución de las fibras que contienen cada una de las distintas formas de GnRH, así como su relación con la localización tisular de los receptores de GnRH, representa también una información crucial ya que la accesibilidad de una determinada forma de GnRH a su receptor constituye un paso crítico para que se desencadenen las respuestas fisiológicas apropiadas. Así, resulta reseñable que la potencia de la forma sbGnRH en la inducción de la secreción de gonadotrofinas (Zohar et al., 1995) o de prolactina (Weber et al., 1997) sea mucho menor comparada con la potencia de las formas cGnRH-II o sGnRH. Sin embargo, los niveles fisiológicos de la forma sbGnRH son sensiblemente superiores en la hipófisis de perciformes, y pueden suplir esta “falta” de bioactividad. Además, de poco serviría la elevada potencia biológica en la inducción de la secreción de gonadotrofinas de isoformas como la cGnRH-II, si estas neurohormonas no resultan accesibles a las células gonadotropas, como parece suceder en la lubina, en la que no encontramos fibras cGnRH-II en la hipófisis. La menor potencia biológica de la forma fisiológicamente activa de GnRH (sbGnRH) podría también estar relacionada con una mayor sensibilidad a la degradación enzimática, y por tanto con una reducción en su vida media en el torrente circulatorio. No obstante, esta actividad biológica disminuida puede ser consecuencia de una menor afinidad en la unión de esta forma de GnRH con el receptor, como consecuencia de una emergencia filogenética relativamente reciente.

3.1.- Receptores de GnRH en el cerebro y la hipófisis de la lubina

En esta dirección, parte de los esfuerzos de nuestro laboratorio se han centrado en estudiar la expresión de los receptores de GnRH el cerebro y la hipófisis de la lubina. Para ello, hemos empleado ribosondas específicas obtenidas a partir del ADN complementario de un receptor de GnRH clonado en esta misma especie (T. Madigou, E. Mañanós, O. Kah, en preparación). La expresión de este receptor de GnRH (GnRH-R) fue especialmente evidente en la hipófisis de la lubina pero también en el telencéfalo ventral, en los núcleos parvocelular, magnocelular y anterior periventricular del área preóptica, en la epífisis, en el núcleo ventromedial del tálamo, en el núcleo del receso lateral y en el núcleo lateral tuberal del hipotálamo.

En la hipófisis, el marcaje aparecía restringido a la pars distal proximal (PPD), y al borde externo de la pars intermedia. Estas regiones de la hipófisis se caracterizan por la presencia de células gonadotropas (Rendón et al., 1997) que, en otros teleosteos, también expresan receptores de GnRH (Cook et al., 1991). En el estudio cualitativo y cuantitativo que realizamos posteriormente, pudimos determinar que la expresión hipofisaria del GnRH-R era más elevada en Noviembre (vitelogénesis final) que en Diciembre (maduración), Febrero (puesta) o Mayo (post-puesta/reposo). Curiosamente, en machos de lubina se ha descrito una elevación significativa de los niveles sbGnRH en el mes de noviembre, que parece responsable del pico en los niveles de GTH-2 plasmática que se observa justo un mes después, en diciembre (Rodríguez et al., 2000). De esta forma, la elevación en los niveles de sbGnRH parece coincidir con el momento del año en el que la expresión del GnRH-R en la hipófisis es más elevada, y ambos fenómenos parecen responsables de la estimulación de la secreción de gonadotrofinas que tiene lugar inmediatamente después. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el receptor de GnRH que estamos estudiando en la lubina es un receptor directamente implicado en la secreción de gonadotrofinas y que su expresión se encuentra sometida a una regulación positiva por sbGnRH. En otras especies de peces, se ha mostrado también que el número de receptores de GnRH hipofisarios varía a lo largo del ciclo reproductivo, presentando un máximo en las fases finales de maduración gonadal (Habibi y Peter, 1991). Asimismo, existen evidencias que demuestran que la GnRH induce la expresión de su propio receptor. De hecho, en la rata, la administración de bajas concentraciones de GnRH determina un incremento de receptores de GnRH en la hipófisis (Kaiser et al., 1993). El tratamiento con análogos de la forma sGnRH también aumenta el número de receptores de alta afinidad a GnRH en la hipófisis de la carpa dorada (Omeljaniuk et al., 1989).

Del mismo modo, se ha demostrado que la gonadectomía y los esteroides gonadales pueden afectar a la expresión de los receptores de GnRH en el cerebro y la hipófisis de mamíferos (Marian et al., 1981; Badr et al., 1988; Seong et al., 1998). En la hipófisis, la expresión del receptor de GnRH aumenta tras la gonadectomía y se ve reducida por la administración de esteroides gonadales (Kaiser et al. 1993, Badr et al., 1988). Sin embargo, los niveles de ARN mensajero del receptor de GnRH en la hipófisis en la rata, aumentaron por el tratamiento combinado con estradiol y progesterona (Seong et al., 1998). En el cerebro de la rata, los efectos de estradiol en la expresión de los receptores de GnRH parecen depender del área donde actúan. Así, el tratamiento con estradiol disminuyó los niveles de receptores de GnRH en el área preóptica pero los aumentó en el hipotálamo mediobasal posterior (Seong et al., 1998). En el caso de la lubina, la expresión del GnRH-R en la hipófisis disminuye en Diciembre/Febrero (maduración-puesta) respecto al mes de Noviembre. Al menos en ejemplares macho de lubina, los niveles de esteroides gonadales alcanzaron su máximo en enero, durante la fase de maduración/puesta (Rodríguez et al., 2000). Una subida similar en los niveles de esteroides podría ser la responsable del descenso observado en la expresión del GnRH-R en la hipófisis de la lubina.

Hasta la fecha, la mayor parte de la información disponible acerca de la expresión del GnRH-R en el cerebro se ha obtenido mediante autorradiografía, usando análogos de GnRH marcados con I^{125} , e hibridación *in situ*. En la rata, el ARNm que codifica el GnRH-R está presente en áreas cerebrales asociadas a la regulación de la liberación de GnRH desde la eminencia media y a la generación de conductas reproductivas (Jennes y Woolums, 1994). En peces, también se ha sugerido la mediación del GnRH-R en la estimulación de conductas reproductivas (Volkoff y Peter, 1999). En *Haplochromis burtoni*, se ha descrito una expresión relevante del ARNm del GnRH-R en el cerebro, la retina y otros tejidos extra-hipofisarios mediante RT-PCR (Robison et al., 2001).

Recientemente, ha sido clonado el GnRH-R de la trucha, y caracterizada su expresión en la hipófisis y el cerebro (Madigou et al., 2000). Así, este GnRH-R se expresa débilmente en la hipófisis pero presenta una intensa expresión en distintos núcleos cerebrales. Esta expresión cerebral del GnRH-R de la trucha resultó especialmente evidente en el área preóptica y en el hipotálamo tuberal-basal, dos regiones claramente implicadas en el control que ejercen los sistemas GnRH sobre la actividad de la hipófisis (Anglade et al., 1993; González-Martínez et al., en revisión). La expresión del GnRH-R también fue notoria en el techo óptico de la trucha, que expresa receptores de melatonina y genes "clock" (Mazurais et al., 1999, 2000) y

parece constituir un centro de control de los ritmos circadianos en el pez cebra (Whitmore et al., 1998). El núcleo lateral de la válvula, en el tegmento mesencefálico de la trucha, también expresa GnRH-R (Madigou et al., 2000). Este núcleo parece estar implicado en el procesamiento de la información sensorial y motora (Meek et al., 1997). Sorprendentemente, este modelo de expresión difiere notablemente del observado por nosotros en la lubina. De esta forma, la discrepancia en la distribución y el bajo nivel de identidad entre los GnRH-R de ambas especies (Figura 7), podría sugerir que representan subtipos diferentes de GnRH-R, y que reconocen formas distintas de GnRH. En nuestro estudio inmunohistoquímico de los sistemas GnRH presentes en la lubina, hemos demostrado que las fibras sbGnRH se restringen a la porción ventral del cerebro anterior, discurriendo hacia la hipófisis, mientras que las fibras sGnRH están profusamente distribuidas por el cerebro, especialmente en el cerebro anterior, y las fibras cGnRH-II alcanzan prácticamente todo el cerebro, pero en este caso son más abundantes en el cerebro medio y posterior. Comparando la distribución del GnRH-R y de las fibras inmunorreactivas a sGnRH, sbGnRH y cGnRH-II en el cerebro de la lubina, parece evidente que la mayoría de células que expresan el GnRH-R se localizan en núcleos que reciben una inervación sGnRH y sbGnRH, principalmente, y en menor medida, de cGnRH-II. Este dato refuerza la consideración de que el GnRH-R descrito en la lubina se corresponde con un receptor de las formas hipofisiotróficas de GnRH, sbGnRH y/o sGnRH, y que está implicado directamente en el control de la actividad reproductiva. Esta hipótesis está apoyada en una intensa expresión del GnRH-R en la hipófisis de la lubina, y en la existencia de diferencias significativas en su expresión durante el ciclo reproductivo, mostrando, como hemos dicho anteriormente, sus niveles más elevados en noviembre, cuando los niveles de sbGnRH también son más altos (Rodríguez et al., 2000). Sin embargo, el receptor de GnRH de la trucha aparece en áreas cerebrales inervadas por fibras cGnRH-II y sGnRH, siendo su expresión muy baja en la hipófisis (Madigou et al., 2000). Estas evidencias sugieren que el receptor de GnRH de la trucha no está involucrado directamente en las acciones estimuladoras de la GnRH sobre la secreción de gonadotrofinas, sino que probablemente desempeña un papel en la mediación de las acciones neurotransmisoras/neuromoduladoras de las formas cGnRH-II y/o sGnRH en el cerebro. Por consiguiente, es probable que más de una forma de GnRH-R exista también en el cerebro de perciformes, como ocurre en otros vertebrados. Así, en la rana toro existen tres tipos de receptores de GnRH que presentan una distribución diferencial: el bfGnRH-R-1 es predominante en la hipófisis, mientras que el bfGnRH-R-2 y el bfGnRH-R-3 se expresan en el cerebro (Wang et al., 2001).

3.2.- Receptores de GnRH en tejidos somáticos de la dorada

Además de estudiar la expresión del receptor de GnRH en el cerebro y la hipófisis de la lubina, en nuestro laboratorio hemos analizado también la distribución de los sitios de unión a GnRH en distintos tejidos somáticos de la dorada. Este estudio nos permitió determinar la presencia de receptores de GnRH en el ovario, músculo esquelético, intestino, estómago y bazo. Asimismo, pudimos determinar que la administración de GnRH y/o 17 β estradiol puede inducir la expresión de sitios de unión a GnRH de manera tejido-dependiente, como se observó en el ovario, intestino, branquia, músculo esquelético, corazón, estómago, riñón y bazo. En vertebrados, incluidos los peces, la expresión de sitios de unión a GnRH y/o receptores de GnRH se ha puesto de manifiesto en a lo largo del eje cerebro-hipófisis-gónada (Marshall et al., 1976; Hsueh y Schaeffer, 1985; Weil et al., 1992; Pagelson y Zohar, 1992; Jennes y Conn, 1994), así como en la placenta (Currie et al., 1981), pero también en tejidos no relacionados de forma directa con la reproducción como el timo (Marchetti et al., 1989), plasma (Chan y Chaplin, 1985), riñón (Patti y Habibi, 1993; Habibi y Pati, 1993), músculo cardíaco, bazo, pulmón (Marshall et al., 1976) y tracto digestivo (Huang et al., 2001). En la gónada, los análogos de la GnRH parecen ejercer acciones estimuladoras sobre la reiniciación de las meiosis ovocitarias (Habibi et al., 1988; Nabissi et al., 2000). En este sentido, la presencia de sitios de unión a GnRH fue detectada en las ovogonias de dorada tras el tratamiento conjunto con GnRH y estradiol. El significado fisiológico de la presencia de sitios de unión a GnRH en el corazón de la dorada resulta una incógnita, pero al menos en otro perciforme, *Haplochromis burtoni*, la expresión del ARNm de la forma sbGnRH fue detectable en el corazón (White y Fernald, 1998). En la carpa dorada, las branquias también acumulan cantidades relevantes de análogos de GnRH, lo que sugiere la presencia de sitios de unión a GnRH en esta especie (Huang et al., 1991), tal como hemos detectado nosotros en la dorada. Estos sitios de unión a GnRH también están presentes en el estómago y el intestino de la dorada. Recientemente, se ha demostrado en la rata que el tracto digestivo puede expresar tanto GnRH como receptores para GnRH y se ha sugerido que la GnRH puede también representar una hormona gastrointestinal (Huang et al., 2001). La expresión extracerebral de la GnRH y la presencia de receptores de GnRH en tejidos somáticos que no están involucrados directamente en la reproducción (Kakar y Genes, 1995; Huang et al., 2001), sugieren un papel importante de estos receptores de GnRH en la mediación de acciones autocrinas/paracrinas de la GnRH sobre la fisiología celular, que aún deben ser esclarecidas.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Adelman JP, Mason AJ, Hayflick JS, Seeburg. 1986. Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotrophin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 83(1):179-83.
- Akutsu S, Takada M, Ohki-Hamazaki H, Murakami S, Arai Y. 1992. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in the chick embryo: effect of the olfactory placode ablation. *Neurosci Lett*.142(2):241-4.
- Alok D, Hassin S, Sampath Kumar R, Trant JM, Yu K, Zohar Y. 2000. Characterization of a pituitary GnRH-receptor from a perciform fish, *Morone saxatilis*: functional expression in a fish cell line. *Mol Cell Endocrinol* 25;168(1-2):65-75.
- Amano M, Oka Y, Aida K, Okumoto N, Kawashima S, Hasegawa Y. 1991. Immunocytochemical demonstration of salmon GnRH and chicken GnRH-II in the brain of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *J Comp Neurol* 314: 587-597.
- Andersson E, Borg B, de Leeuw R. 1989. Characterization of gonadotrophin-releasing hormone binding sites in the pituitary of the three-spinned stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Gen Comp Endocrinol* 76(1):41-45.
- Anglade I, Zandbergen T, Kah O. 1993. Origin of the pituitary innervation in the goldfish. *Cell Tissue Res* 273: 345-355.
- Badr M, Marchetti B, Pelletier G. 1988. Modulation of hippocampal LHRH receptors by sex steroids in the rat. *Peptides Mar-Apr*;9(2):441-2.
- Barnabé G. 1974. Contribution a la connaissance de la biologie de la loup *Dicentrarchus labrax*. These Doctorant Etat, mention sciences, Univ. Sc. Techn. Languedoc, Montpellier, 426 p.
- Barnabé and Billard. 1994. *Acuicultura: La cría de lubina y de dorada*. Eds Omega, pp:573-612.
- Batten TF, Cambre ML, Moons L, Vandesande F. 1990. Comparative distribution of neuropeptide-immunoreactive systems in the brain of the green molly, *Poecilia latipinna*. *J Comp Neurol*. 302: 893-919.
- Ben-Tuvia A. 1979. Studies of the population in fisheries of *Sparus aurata* in the Bardawil Lagoon, esastern Mediterranean. *Inv. Pesq.* 43, 43-67.
- Breton B, Weill C, Jalabert B and Billard R. 1972. Activité reciproque des facteurs hypothalamiques de belier (*Ovis aries*) et de poissons teleosteens sur la secretion in vitro des hormones gonadotropes c-HG et LH respectivement par des hypophysés de carpe et de belier. *CR Acad Sci (III)*. 264: 2530-2533.
- Bull P, Morales P, Huyser C, Socias T, Castellon EA. 2000. Expression of GnRH receptor in mouse and rat testicular germ cells. *Mol Hum Reprod*; 6(7):582-6.
- Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellows R, Blackwell R, Vale W, Guillemin R. 1972. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF). *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 278-282.
- Cambré M, Mareels G, Corneillie S, Moons L, Ollevier F, Vandesande F. 1990. Chronological appearance of the different hypophysial hormones in the pituitary of sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) during their early development: an immunocytochemical demonstration. *Gen Comp Endocrinol*. 77:408-415.

- Carolsfeld J, Powell JF, Park M, Fischer WH, Craig AG, Chang JP, Rivier JE, Sherwood NM. 2000. Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, from an ancient teleost, herring. *Endocrinology* 141:505-512.
- Cerdá-Reverter JM, Zanuy S, Muñoz-Cueto JA. 2001a. Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). I. The telencephalon. *J Morphol.* 247:217-228.
- Cerdá-Reverter JM, Zanuy S, Muñoz-Cueto JA. 2001b. Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). I. The diencephalon. *J Morphol.* 247:229-251.
- Chan RL, Chaplin MD. 1985. Plasma binding of LHRH and nafarelin acetate, a highly potent LHRH agonist. *Biochem Biophys Res Commun*; 127:673-679.
- Chiba H, Nakamura M, Iwata M, Sakuma Y, Yamauchi K, Parhar IS. 1999. Development and differentiation of gonadotropin hormone-releasing hormone neuronal systems and testes in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Gen Comp Endocrinol*; 114(3):449-59.
- Chieffi G, Pierantoni R, Fasano S. 1991. Immunoreactive GnRH in hypothalamic and extrahypothalamic areas. *Int Rev Cytol*;127:1-55.
- Conn PM, Crowley WF Jr. 1994. Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu Rev Med*; 45:391-405. Review.
- Cook H, Berkenbosch JW, Fernhout MJ, Yu KL, Peter RE, Chang JP, Rivier JE. 1991. Demonstration of gonadotropin releasing-hormone receptors on gonadotrophs and somatotrophs of the goldfish: an electron microscope study. *Regule Pept*; 36(3): 369-378.
- Currie AJ, Fraser HM, Sharpe RM. 1981. Human placental receptors for luteinizing hormone releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 99:332-338.
- D'Ancona U. 1941. Ulteriori conservazioni e considerazioni sull'ermafroditismo ed il differenziamento sessuale dell'orata *Sparus aurata* L. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 18, 313-336.
- De Leeuw R, Habibi HR, Nahorniak CS, Peter RE. 1989. Dopaminergic regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormonereceptor activity in the goldfish (*Carassius auratus*). *J Endocrinol*;121(2): 239-247.
- De Leeuw R, Van't Veer C, Goos HJ, Van Oordt PG. 1988. The dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor binding in the pituitary of the african catfish, *Clarias gariepinus*. *Gen Comp Endocrinol* 72(3): 408-415.
- Dellovade TL, King JA, Millar RP, Rissman EF. 1993. Presence and differential distribution of distinct forms of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone in the musk shrew brain. *Neuroendocrinology* 58:166-177.
- Eidne KA, Sellar RE, Couper G, Anderson L, Taylor PL. 1992. Molecular cloning and characterisation of the rat pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. *Mol Cell Endocrinol*; 90(1):R5-9.
- Fernald RD, White RB. 1999. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Front Neuroendocrinol.* 20:224-240.
- González-Martínez D, Madigou T, Zmora N, Anglade I, Zanuy S, Zohar Y, Elizur A, Muñoz-Cueto JA, Kah O. 2001. Differential expression of three different prepro-GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Comp Neurol.* 429:144-155.

- Goos HJ, de Leeuw R, de Zoeten-Kamp C, Peute J, Blahser S. 1985. Gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive neuronal structures in the brain and pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Cell Tissue Res.* 241: 593-596.
- Gothilf Y, Meiri I, Elizur A, Zohar Y. 1997. Preovulatory changes in the levels of three gonadotropin-releasing hormone-encoding messenger ribonucleic acids (mRNAs), gonadotropin beta-subunit mRNAs, plasma gonadotropin, and steroids in the female gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Biol Reprod* 57:1145-1154.
- Gothilf Y, Muñoz-Cueto JA, Sagrillo CA, Selmanoff M, Chen TT, Kah O, Elizur A, Zohar Y. 1996. Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. *Biol Reprod*; 55:636-645.
- Habibi HR, Patti D. 1993. Extrapituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding sites in goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry* 11:43-49.
- Habibi HR, Peter RE, Sokolowska M, Rivier JE, Vale WW. 1987. Characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding to pituitary receptors in goldfish (*Carassius auratus*). *Biol Reprod* 36: 844-853.
- Habibi HR, Peter RE. 1991. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptors in teleost. *Reproductive Physiology of Fish* (A.P. Scott et al., eds), *FishSymp* 91, Sheffield; pp:109-113.
- Habibi HR, Van Der Kraak G, Bulanski E, Peter RE. 1988. Effects of teleost GnRH on reinitiation of oocyte meiosis in goldfish in vitro. *Am J Physiol*;225:R268-R-272.
- Happe A, Zohar Y. 1988. Self-fertilization in the proteandrus hermafroditic *Sparus aurata*: Development of the technology. In: *Reproduction in fish- Basic and Applied Aspects* (Zohar and Breton eds.),. Paris, France: INRA Press, 177-180.
- Holland MCH, Gothilf Y, Meiri I, King JA, Okuzawa K, Elizur A, Zohar Y. 1998. Levels of the native forms of GnRH in the pituitary of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, at several characteristic stages of the gonadal cycle. *Gen Comp Endocrinol* 112: 394-405.
- Hsueh AJ, Schaeffer JM. 1985. Gonadotropin-releasing hormone as a paracrine hormone and neurotransmitter in extra-pituitary sites. *J Steroid Biochem* 23:757-764.
- Huang YP, Peng C, Peter RE. 1991. Metabolism of gonadotropin-releasing hormone in goldfish: serum clearance and tissue uptake studies. *Gen Comp Endocrinol*; 84(1):67-75.
- Huang W, Yao B, Sun L, Pu R, Wang L, Zhang R. 2001. Immunohistochemical and in situ hybridization studies of gonadotropin releasing hormone (GnRH) and its receptor in rat digestive tract. *Life Sci.* 2; 68(15):1727-34.
- Illing, N., Troskie, B.E., Nahorniak, C.S., Hapgood, J.P., Peter, R.E., Millar, R.P., 1999. Two gonadotropin-releasing hormone receptor subtypes with distinct ligand selectivity and differential distribution in brain and pituitary in the goldfish (*Carassius auratus*). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96, 2526–2531.
- Iwakoshi E, Takuwa-Kuroda K, Fujisawa Y, Hisada M, Ukena K, Tsutsui K, Minakata H. 2001. Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. 14th International Congress of Comparative endocrinology, 26-30, p.55.
- Jennes L and Conn PM. 1994. Gonadotropin-releasing hormone and its receptor in rat brain. *Front Neuroendocrinology*; 15:51-77.
- Jennes L, Woolums S. 1994. Localization of GnRH-R mRNA in the rat brain. *Endocrine*; 2: 521-528.

- Jimenez-Liñán M, Rubin BS, King JC. 1997. Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain. *Endocrinology*; 138(10):4123-30.
- Kah O, Breton B, Dulka JG, Nunez-Rodríguez J, Peter RE, Corrigan A, Rivier JE, Vale WW. 1986. A reinvestigation of the GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) systems in the goldfish brain using antibodies to salmon Gn-RH. *Cell Tissue Res* 244:327-337.
- Kah O, Zanuy S, Mañanós E, Anglade Y, Carrillo M. 1991. Distribution of salmon gonadotropin releasing-hormone in the brain and pituitary of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Cell Tissue Res*; 266:129-136.
- Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A, Chin WW. 1993. Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro. *Endocrinology* 133:931-934.
- Kakar SS, Musgrove LC, Devor DC, Sellers JC, Neill JD. 1992. Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 30;189(1):289-95.
- Kakar SS, Jenness L. 1995. Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor mRNAs in various non-reproductive human tissues. *Cancer Lett* 27;98(1):57-62.
- Kasten TL, White SA, Norton TT, Bond CT, Adelman JP, Fernald RD. 1996. Characterization of two new preproGnRH mRNAs in the tree shrew: first direct evidence for mesencephalic GnRH gene expression in a placental mammal. *Gen Comp Endocrinol*;104(1):7-19.
- King JA, Millar RP. 1982a . Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone I. Structural determination on partially purified material. *J Biol Chem* 257: 10722-10728.
- King JA, Millar RP. 1982b. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone II. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 257:10729-10732.
- Knox, C.J., Boyd, S.K., Sower, S.A., 1994. Characterization and localization of gonadotropin-releasing hormone receptors in the adult female sea lamprey, *Petromyzon marinus*. *Endocrinology* 134, 492–498.
- Kogo H, Kudo A, Park MK, Mori T, Kawashima S. 1995. In situ detection of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor mRNA expression in the rat ovarian follicles. *J Exp Zool.* 1; 272(1):62-8.
- Leranth C, Segura LM, Palkovits M, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. 1985. The LH-RH-containing neuronal network in the preoptic area of the rat: demonstration of LH-RH-containing nerve terminals in synaptic contact with LH-RH neurons. *Brain Res.* 345: 332-336.
- Lescheid DW, Terasawa E, Abler LA, Urbanski HF, Warby CM, Millar RP, Sherwood NM. 1997. A second form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) with characteristics of chicken GnRH-II is present in the primate brain. *Endocrinology* 138: 5618-5629.
- Lovejoy DA, Fischer WH, Ngamvongchon S, Craig AG, Nahorniak CS, Peter RE, Rivier JE, Sherwood NM. 1992. Distinct sequence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6373-6377.
- Madigou T, Mañanós-Sanchez E, Hulshof S, Anglade I, Zanuy S, Kah O. 2000. Cloning, tissue distribution, and central expression of the gonadotropin-releasing hormone receptor in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod*; 63(6):1857-66.

- Marchant TA, Chang JP, Nahornial CS, Peter RE. 1989. Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish. *Endocrinology* 124: 2509–2518.
- Marchetti B, Guarcello V, Morale MC, Bartoloni G, Farinella Z, Cordaro S, Scapagnini U. 1989. Luteinizing releasing-hormone hormone-binding sites in the rat thymus: characteristics and biological function. *Endocrinology* 125: 1025-1036.
- Marian J, Cooper RL, Conn PM. 1981. Regulation of the rat pituitary releasing-hormone receptor. *Mol Pharmacol*; 19: 399-405.
- Marshall JC, Shakespear RA, Odell WD. 1976. LHRH-pituitary plasma membrane binding: the presence of specific binding sites in other tissues. *Clin Endocrinol*: 5: 671-677.
- Mason AJ, Pitts SL, Nikolics K, Szonyi E, Wilcox JN, Seeburg PH, Stewart TA. 1986. The hypogonadal mouse: reproductive functions restored by gene therapy. *Science* 234, 1372-1378.
- Matsuo H, Baba Y, Nair RMG, Arimura A, Schally AV. 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 43: 1334-1339.
- Mazurais D, Brierley I, Anglade I, Drew J, Randall C, Bromage N, Michel D, Kah O, Williams LM. 1999. Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. *J Comp Neurol* 409: 313-324.
- Mazurais D, Le Drean G, Brierley I, Anglade I, Bromage N, Williams LM, Kah O. 2000. Expression of clock gene in the brain of rainbow trout: comparison with the distribution of melatonin receptors. *J Comp Neurol*. 422:612-620.
- Mikami S, Yamada S, Hasegawa Y, Miyamoto K. 1988. Localization of avian LHRH-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the domestic fowl, *Gallus domesticus*, and the Japanese quail, *Coturnix coturnix*. *Cell Tissue Res* 251:51-58.
- Millar RP, King JA. 1994. Plasticity and conservation in gonadotropin-releasing hormone structure and function. In Davey KG, Peter RE, Tobe SS, editors. *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Ottawa: National Research Council of Canada, pp. 129-136.
- Millar RP, Wormald PJ, Milton RCL. 1986. Stimulation of gonadotropin release by non-GnRH peptide sequence of the GnRH precursor. *Science* 232, 68-70.
- Miyamoto K, Hasegawa I, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H. 1984. Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: Evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3874-3878.
- Miyamoto K, Hasegawa Y, Minegishi T, Nomura M, Takahashi Y, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H. 1982. Isolation and characterization of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 107: 820-827.
- Montaner AD, Somoza GM, King JA, Bianchini JJ, Bolis CG, Affanni JM. 1998. Chromatographic and immunological identification of GnRH (gonadotropin-releasing hormone) variants. Occurrence of mammalian and a salmon-like GnRH in the forebrain of an eutherian mammal: *Hydrochaeris hydrochaeris* (Mammalia, Rodentia). *Regul Pept*. 73:197-204.

- Montaner AD, Affanni JM, King JA, Bianchini JJ, Tonarelli G, Somoza GM. 1999. Differential distribution of gonadotropin-releasing hormone variants in the brain of *Hydrochaeris hydrochaeris* (Mammalia, Rodentia). *Cell Mol Neurobiol*. 19: 635-651.
- Montaner AD, Park MK, Fischer WH, Craig AG, Chang JP, Somoza GM, Rivier JE, Sherwood NM. 2001. Primary structure of a novel gonadotropin-releasing hormone in the brain of a teleost, pejerrey. *Endocrinology*. 142:1453-1460.
- Montero M, Vidal B, Vandesande F, King JA, Tramu G, Dufour S, Kah O. 1994. Comparative distribution of mammalian GnRH (Gonadotrophin-Releasing Hormone) and chicken GnRH-II in the brain of the European eel. *J Chem Neuroanat* 7: 227-241.
- Murakami S, Kikuyama S, Arai Y. 1992. The origin of the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in newts (*Cynops pyrrhogaster*): the effect of olfactory placode ablation. *Cell Tissue Res*. 269:21-27.
- Murakami S, Seki T, Wakabayashi K, Arai Y. 1991. The ontogeny of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) producing neurons in the chick embryo: possible evidence for migrating LHRH neurons from the olfactory epithelium a highly polysialylated neural cell adhesion molecule. *Neurosci Res*;12(3):421-31.
- Muske LE, Moore FL. 1990. Ontogeny of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone neuronal systems in amphibians. *Brain Res*.534:177-187.
- Muske LE, Moore FL. 1994. Antibodies against different forms of GnRH distinguish different populations of cells and axonal pathways in a urodele amphibian, *Taricha granulosa*. *J Comp Neurol* 345: 139-147.
- Muske LE. 1993. Evolution of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems. *Brain Behav Evol*. 42: 215-230.
- Nabissi M, Soverchia L, Polzonetti-Magni AM, Habibi HR. 2000. Differential splicing of three gonadotropin-releasing hormone transcripts in the ovary of seabream (*Sparus aurata*). *Biol Reprod* 62:1329-1334.
- Nicolics K, Mason AJ, Szonyi E, Ramachandran J, Seeburg PH. 1985. A prolactin-inhibiting factor within the precursor for human GnRH. *Nature* 316, 511-517.
- Ngamvongchon S, Lovejoy DA, Fischer WH, Craig AG, Nahorniak CS, Sherwood NM. 1992. Primary structure of two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Mol Cell Neurosci* 3: 17-22.
- Norgren RB Jr, Gao C. 1994. LHRH neuronal subtypes have multiple origins in chickens. *Dev Biol*. 165:735-738.
- Northcutt RG, Muske LE. 1994. Multiple embryonic origins of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactive neurons. *Dev Brain Res* 78:279-290.
- Norwitz ER, Cardona GR, Jeong KH, Chin WW. 1999. Identification and characterization of the gonadotropin-releasing hormone response elements in the mouse gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *J Biol Chem*. 274:867-880.
- Okuzawa K, Granneman J, Bogerd J, Goos HJTh, Zohar Y, Kagawa H. 1997. Distinct expression of GnRH genes in the red seabream brain. *Fish Physiol Biochem* 17:71-79.
- Omeljaniuk RJ, Habibi RH, Peter RE. 1989. Alterations in pituitary GnRH and dopamine receptors associated with the seasonal variation and regulation of gonadotropin release in the goldfish *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 74(3):392-399.

- Ookura T, Okuzawa K, Tanaka H, Gen K, Kagawa H. 1999. The ontogeny of gonadotrophin-releasing hormone neurons in the red seabream. In: Abstracts of the VI International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. University of Bergen, p:13.
- Pagelson G, Zohar Y. 1992. Characterization of gonadotropin-releasing hormone binding to pituitary receptors in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biology of Reproduction* 47:1004-1008.
- Parhar IS, Soga T, Ishikawa Y, Nagahama Y, Sakuma Y. 1998. Neurons synthesizing gonadotropin-releasing hormone mRNA subtypes have multiple developmental origins in the medaka. *J Comp Neurol* 401: 217-226.
- Parhar IS. 1997. GnRH in tilapia: three genes, three origins and their roles. In: Parhar IS, Sakuma Y, editors. *GnRH Neurons: Gene to Behavior*. Tokyo: Brain Shuppan. Chapter 5, p 99-122.
- Patti D, Habibi HR. 1993. Characterization of gonadotropin-releasing hormone receptors in goldfish ovary: variation during follicular development. *Am J Physiol* 264: R227-R234.
- Polkowska J, Przekop F. 1993. Effect of protein deficiency on luteinizing hormone releasing hormone (LHRH), gonadotropin releasing hormone associated peptide (GAP) and luteinizing hormone (LH) immunocytochemistry in the hypothalamus and pituitary gland of prepubertal ewes. *Exp Clin Endocrinol* 101: 230-237.
- Powell JFF, Reska-Skinner S, Prakash MO, Fisher WH, Park M, Rivier JE, Craig AG, Mackie GO, Sherwood NM. 1996. Two new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10461-10464.
- Powell JFF, Zohar Y, Elizur A, Park M, Fischer WH, Craig AG, Rivier JE, Lovejoy DA, Sherwood NM. 1994. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12081-12085.
- Quanbeck C, Sherwood NM, Millar RP, Terasawa E. 1997. Two populations of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the forebrain of the rhesus macaque during embryonic development. *J Comp Neurol*. 380:293-309.
- Reinhart J, Mertz LM, Catt KJ. 1992. Molecular cloning and expression of cDNA encoding the murine gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 25;267(30):21281-4.
- Rendón C, Rodríguez-Gomez FJ, Muñoz-Cueto JA, Pinuela C, Sarasquete C. 1997. An immunocytochemical study of pituitary cells of the Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup 1858). *Histochem J*. Nov-Dec;29(11-12):813-22.
- Rissman EF, Li X.. 1998. Sex differences in mammalian and chicken-II gonadotropin-releasing hormone immunoreactivity in musk shrew brain. *Gen Comp Endocrinol*. 112:346-355.
- Robinson RR, White RB, Illing N, Troskie BE, Morley M, Millar RP, Fernald RD. 2001. Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor in the Teleost *Haplochromis burtoni*: Structure, Location, and Function. *Endocrinology* 1;142(5):1737-1743.
- Roblin C, Brusle J. 1983. Gonadal ontogenesis and sex differentiation in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*, under fish-farming conditions. *Reprod Nutr Dev*.23:115-127.
- Rodríguez L, Carrillo M, Sorbera LA, Soubrier MA, Mañanós E, Holland MC, Zohar Y, Zanuy S. 2000. Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. *Gen Comp Endocrinol*. 120: 67-74.

- Rodríguez-Gómez FJ, Rendón MC, Sarasquete C, Muñoz-Cueto JA. 1999. Distribution of gonadotropin-releasing hormone immunoreactive systems in the brain of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *Histochem J*; 31(11):695-703.
- Ronchi E, Aoki C, Krey LC, Pfaff DW. 1992. Immunocytochemical study of GnRH and GnRH-associated peptide in male Syrian hamsters as a function of photoperiod and gonadal alterations. *Neuroendocrinology* 55:134-145.
- Schally AV, Arimura A, Baba Y, Nair RMG, Matsuo H, Redding TW, Debeljuk L. 1971. Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochemical and Biophysical research communications*. Vol 3, 2, Pp393-399.
- Schulz RW, Bosma PT, Zandbergen MA, Van der Sanden MC, Van Dijk W, Peute J, Bogerd J, Goos HJTh. 1993. Two gonadotropin-releasing hormones in the African catfish, *Clarias gariepinus*: localization, pituitary receptor binding, and gonadotropin release activity. *Endocrinology* 133: 1569-1577.
- Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. 1989. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Brain Res Mol Brain Res* Dec;6(4):311-26.
- Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. 1989. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338:161-164.
- Schwanzel-Fukuda M. 1999. Origin and migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in mammals. *Microsc Res Tech*. 44: 2-10.
- Sealfon, S.C., Weinstein, H., Millar, R.P., 1997. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr. Rev.* 18, 180–205.
- Seeburg PH, Mason AJ, Young WS 3rd, Stewart TA, Nikolics K. 1989. The gene encoding GnRH and its associated peptide GAP: some insights into hypogonadism. *J Steroid Biochem*; 33(4B):687-91.
- Senthikumar B, Okuzawa K, Gen K, Ookura T, Kagawa H. 1999. Distribution and seasonal variation in levels of three native GnRHs in the brain and pituitary of perciform fish. *J Neuroendocrinol* 11: 181-186.
- Seong JY, Kang SS, Kam K, Han YG, Kwon HB, Ryu K, Kim K. 1998. Differential regulation of gonadotropin releasing-hormone (GnRH) receptor expression in the posterior mediobasal hypothalamus by steroid hormones: implication of GnRH neuronal activity. *Brain Res Mol Brain Res*; 53(1-2):226-235.
- Sherwood N, Eiden L, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W. 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2794-2798.
- Sherwood NM, Zoeller RT, Moore FL. 1986. Multiple forms of gonadotropin-releasing hormone in amphibian brains. *Gen Comp Endocrinol.* 61:313-322.
- Sherwood NM, Lovejoy DA, Coe IR. 1993. Origin of mammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocr Rev.* 14: 241-254.
- Sherwood NM, Parker DB, McRory JE, Lescheid DW. 1994. Molecular evolution of GHRH and GnRH. *Molecular endocrinology of fish*, Vol 13, 29-66.
- Sower SA, Chiang YC, Lovas S, Conlon JM. 1993. Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *Endocrinology* 132: 1125-1131.

- Subheader N, Rama Krishna NS. 1988. Immunocytochemical localization of LH-RH in the brain and pituitary of the catfish, *Clarias batrachus* (Linn). *Gen Comp Endocrinol* 72: 431-444.
- Tensen, C., Okuzawa, K., Blomenrohr, M., Rebers, F., Leurs, R., Bogerd, J., Schulz, R., Goos, H., 1997. Distinct efficacies for two endogenous ligands on a single cognate gonadoliberin receptor. *Eur. J. Biochem.* 243, 134–140.
- Troskie B, Illing N, Rumbak E, Sun YM, Hapgood J, Sealfon S, Conklin D, Millar R. 1998. Identification of three putative GnRH receptor subtypes in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol.* 112: 296-302.
- Troskie, B.E., Hapgood, J.P., Millar, R.P., Illing, N., 2000. Complementary deoxyribonucleic acid cloning, gene expression, and ligand selectivity of a novel gonadotropin-releasing hormone receptor expressed in the pituitary and midbrain of *Xenopus laevis*. *Endocrinology* 141, 1764–1771.
- Trudeau VL, Murthy CK, Habibi HR, Sloley BD, Peter RE. 1993. Effects of sex steroid treatments on gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin secretion from the goldfish pituitary. *Biol Reprod* 48(2): 300-307.
- Tsutsumi, M., Zhou, W., Millar, R.P., Mellon, P.L., Roberts, J.L., Flanagan, C.A., Dong, K., Gillo, B., Sealfon, S.C. 1992. Cloning and functional expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* 6, 1163–1169.
- Urbanski HF, White RB, Fernald RD, Kohama SG, Garyfallou VT, Densmore VS. 1999. Regional expression of mRNA encoding a second form of gonadotropin-releasing hormone in the macaque brain. *Endocrinology* 140: 1945-1948.
- Volkoff H, Peter RE. 1999. Actions of two forms of gonadotropin releasing hormone and a GnRH antagonist on spawning behavior of the goldfish *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol.* 116:347-355.
- von Schalburg KR, Harrower WL, Sherwood NM. 1999. Regulation and expression of gonadotropin-releasing hormone in salmon embryo and gonad. *Mol Cell Endocrinol.* 157:41-54.
- Wang L, Bogerd J, Choi HS, Seong JY, Soh JM, Chun SY, Blomenrohr M, Troskie BE, Millar RP, Yu WH, McCann SM, Kwon HB. 2001. Three distinct types of GnRH receptor characterized in the bullfrog. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 361-366.
- Weber GM, Powell JF, Park M, Fischer WH, Craig AG, Rivier JE, Nanakorn U, Parhar IS, Ngamvongchon S, Grau EG, Sherwood NM. 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.
- Weil C, Crim LW, Wilson CE, Cauty C. 1992. Evidence of GnRH receptors in cultured pituitary cells of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum). *Gen Comp Endocrinol* 85:156-164.
- Wetsel WC, Valenca MM, Merchantaler I, Liposits Z, Lopez FJ, Weiner RI, Mellon PL, Negro-Vilar A. 1991. Intrinsic pulsatile secretory activity of immortalized LHRH-secreting neurons. *Proc. Natl. Sci. Acad. USA* 92, 8363-8367.
- White RB, Fernald RD. 1998a. Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormone genes in one species. *Gen Comp Endocrinol* 112: 17-25.

- White RB, Fernald RD. 1998b. Ontogeny of GnRH gene expression reveals a distinct origin for GnRH-containing neurons in the midbrain. *Gen Comp Endocrinol* 112: 322-329.
- White RB, White SA, Fernald RD. 1998. Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 305-309.
- White SA, Kasten TL, Bond CT, Adelman JP, Fernald RD. 1995. Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel role for an ancient peptide. *Proc natl Acad Sci USA*; 92: 8363-8367.
- Whitmore D, Foulkes NS, Strahle U, Sassone-Corsi P. 1998. Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators. *Neurosci*. 1:701-707.
- Witkin JW, Silverman AJ. 1985. Synaptology of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in rat preoptic area. *Peptides*.6: 263-271.
- Witkin JW. 1999. Synchronized neuronal networks: the GnRH system. *Microsc Res Tech*. 44: 11-18.
- Wolfahrt S, Kleine B, Rossmannith WG. 1998. Detection of gonadotrophin releasing hormone and its receptor mRNA in human placental trophoblasts using in-situ reverse transcription-polymerase chain reaction. *Mol Hum Reprod*; 4(10):999-1006.
- Wray S, Grant P, Gainer H. 1989a. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86:8132-8136.
- Wray S, Nieburgs A, Elkabes S. 1989b. Spatiotemporal cell expression of luteinizing hormone-releasing hormone in the prenatal mouse: evidence for an embryonic origin in the olfactory placode. *Dev Brain Res*. 46:309-318.
- Yahalom D, Chen A, Ben-Aroya N, Rahimipour S, Kaganovsky E, Okon E, Fridkin M, Koch Y. 1999. The gonadotropin-releasing hormone family of neuropeptides in the brain of human, bovine and rat: identification of a third isoform. *FEBS Lett* 463: 289-294.
- Yamamoto N, Oka Y, Amano M, Aida K, Hasegawa Y, Kawashima S. 1995. Multiple gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactivity system in the brain of the dwarf gourami, *Colisa lalia*: Immunohistochemistry and radioimmunoassay. *J Comp Neurol* 355: 354-368.
- Yamamoto N, Oka Y, Kawashima S. 1997. Lesions of gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive terminal nerve cells: effects on the reproductive behavior of male dwarf gouramis. *Neuroendocrinology* 65: 403-412.
- Yu KL, He ML, Chik CC, Lin XW, Chang JP, Peter RE. 1998. mRNA expression of gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) and GnRH receptor in goldfish. *Gen Comp Endocrinol*; 112(3):303-11.
- Yu KL, Sherwood NM, Peter RE. 1988. Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides* 9: 625-630.
- Zandbergen MA, Kah O, Bogerd J, Peute J, Goos HJTh. 1995. Expression and distribution of two gonadotropin-releasing hormones in the catfish brain. *Neuroendocrinology* 62: 571-578.
- Zohar Y, Elizur A, Sherwood NM, Powell JF, Rivier JE, Zmora N. 1995. Gonadotropin-releasing activities of the three native forms of gonadotropin-releasing hormone present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen Comp Endocrinol* 97: 289-299.