

CHAYRRA CHEHADE GOMES

**LOCALIZAÇÃO DAS DIFERENTES FORMAS DE GnRH NO ENCÉFALO DE
Astyanax altiparanae (GARUTTI E BRITSKI, 2000) E *Danio rerio* (HAMILTON,
1822)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Borella

São Paulo
2010

RESUMO

Gomes CC. Localização das diferentes formas de GnRH no encéfalo de *Astyanax altiparanae* (Garutti e Britski, 2000) e de *Danio rerio* (Hamilton, 1822) [Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

O GnRH é um decapeptídeo que está envolvido na reprodução, estimulando a glândula hipófise a liberar gonadotropinas (LH e FSH), que, por sua vez, irão regular a esteroidogênese e gametogênese. No entanto, além da função reprodutiva, o GnRH exibe funções de neuromodulação com implicações na modulação de comportamento sexual. Os padrões de distribuição no encéfalo de distintas isoformas de GnRH podem ajudar a revelar a função específica de cada GnRH. Com isso, a principal ênfase deste estudo é detectar a presença, distribuição e/ou expressão gênica de diferentes formas de GnRH no encéfalo de teleósteos de água doce, *Astyanax altiparanae* (lambari) e *Danio rerio* (zebrafish), os quais têm grande importância comercial, ecológica e acadêmica. Foi utilizado o método de imunohistoquímica de peroxidase com os anticorpos anti-GnRH3 (anti-sGnRH) e anti-GnRH1 (anti-sbGnRH) para detectar os GnRHs no encéfalo e na glândula hipófise. Em *Astyanax altiparanae* foi encontrada imunorreatividade ao anti-GnRH3 nos seguintes locais: corpos celulares dos neurônios do torus longitudinalis, núcleo glomerular, núcleo posterior central e dorsal do tálamo dorsal, no bulbo olfatório, no núcleo do tegumento do encéfalo médio, nos gânglios do nervo terminal e na área préóptica. Além disso, os corpos celulares dos neurônios dos núcleos periventricular parvocelular e magnocelular e do núcleo ventral tuberal foram imunorreativos para anti-GnRH3, juntamente com um grande número de fibras, incluindo as que inervam a neuro-hipófise. Imunorreatividade para GnRH1 foi encontrada apenas em fibras, com nenhum corpo celular positivo. Este é o primeiro estudo descrevendo a distribuição do sistema de GnRH1 e GnRH3 no cérebro do *Astyanax altiparanae*. Em *Danio rerio* foi encontrada imunorreatividade ao anti-GnRH3 nos núcleos da região hipotalâmica e em um grande número de fibras, incluindo as que inervam a neuro-hipófise.

Palavras-chave: *Astyanax altiparanae*. *Danio rerio*. GnRH1. GnRH3. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Gomes CC. Localization of different forms of GnRH in the brain of *Astyanax altiparanae* (Garutti and Britski, 2000) and *Danio rerio* (Hamilton, 1822). (Master thesis). São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2010.

The GnRH is well known as a key decapeptide neurohormone involved in reproduction, stimulating the pituitary gland to release gonadotropins (LH and FSH), which, in turn, regulate the steroidogenesis and gametogenesis. However, in addition to the reproductive function, the GnRH displays neuromodulatory roles with implications in the modulation of sexual behavior. The patterns of distribution in the brain of distinct isoforms of GnRH may help reveal each GnRH specific function. Therefore, the main emphasis of this study is to detect the presence, distribution and/or gene expression of different forms of GnRH in the brain of the freshwater teleosts *Astyanax altiparanae* (lambari) and *Danio rerio* (zebrafish), which have great commercial, ecological and academic importance. The immunohistochemical method of peroxidase with antibodies anti-GnRH3 (anti-sGnRH) and anti-GnRH1 (anti-sbGnRH) was used to detect GnRHs in the brain and pituitary gland. In *Astyanax altiparanae* immunoreactivity to anti-GnRH3 was found in the following encephalic areas: cell bodies from neurons in torus longitudinalis, glomerular nucleus, central and dorsal posterior nuclei of dorsal thalamus, nucleus of tegmentum mesencephalic, olfactory bulb, terminal nerve ganglion, and preoptic area. In addition, cell bodies from neurons in the parvocellular and magnocellular periventricular nuclei and ventral tuberal nucleus were immunoreactive to anti-GnRH3, along with a large number of fibers, including the ones which innervate the neurohypophysis. Immunoreactivity for GnRH1 was found only in fibers, with no positive cell bodies. This is the first study describing the distribution of the system of GnRH1 and GnRH3 in the brain of the *Astyanax altiparanae*. In *Danio rerio* immunoreactivity to anti-GnRH3 was found in hypothalamic nuclei and in a large number of fibers, including the ones which innervate the neurohypophysis.

Keywords: *Astyanax altiparanae*. *Danio rerio*. GnRH1. GnRH3. Immunohistochemical technique.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Espécies

Os peixes ósseos representam aproximadamente metade de todos os vertebrados existentes, constituindo em torno de 30.000 espécies (Northcutt, 2008), sendo assim o grupo mais abundante e diversificado entre todos os vertebrados, apresentando também grande variação fisiológica e comportamental de uma espécie para a outra.

A maior diversidade dos peixes de água doce do planeta é encontrada no Brasil (Lowe McConell, 1999). Ao mesmo tempo, faltam estudos na literatura revelando as particularidades da biologia das espécies brasileiras, o que pode levar a maior dificuldade para cultivá-las. Por sua vez, isto pode acarretar na introdução de espécies exóticas, como a carpa e a tilápia. Porém, a introdução de espécies não nativas pode gerar grandes problemas ambientais, podendo levar inclusive à extinção de espécies brasileiras por competição, predação e/ou miscigenação.

Além disso, outras atividades antrópicas estão ameaçando as espécies nativas, como as atividades de desmatamento, que resultam na perda da zona tampão entre sistemas terrestres e aquáticos; a mineração, que produz alterações físicas e químicas extremamente elevadas nos sistemas, além de provocar o assoreamento dos componentes hídricos; a construção de rodovias e ferrovias, que promove a drenagem de áreas alagadas; e a remoção de florestas, com alterações na estrutura dos rios e lagos ao longo das obras. Impactos continuados ainda podem ser causados por despejos de material residual proveniente de fontes orgânicas ou inorgânicas (David et al., 2006).

Desta forma, a pesquisa básica que ajuda a desvendar particularidades de aspectos vitais para a população em questão, como o controle da reprodução, pode contribuir para amenizar tais estragos causados por agentes agressores à diversidade da ictiofauna, corroborando ainda com informações que preencham as muitas lacunas existentes na área acadêmica, principalmente referindo-se às espécies de peixes sul americanas.

Tendo em vista o citado acima, deliberamos estudar duas espécies de teleósteos de ordens diferentes, o *Astyanax altiparanae* (lambari), uma espécie sul americana, e o *Danio rerio* (zebrafish), uma espécie da Ásia Central que servirá

como base comparativa para os estudos com lambari, uma vez que existem vários aspectos de sua biologia já conhecidos por se tratar de um modelo biológico mundialmente aceito na atualidade.

1.1.1 *Astyanax altiparanae* (Lambari)

A espécie *Astyanax altiparanae* não havia sido descrita até 2000, quando revisões sistemáticas e filogenéticas, realizadas no gênero *Astyanax*, verificaram que o *Astyanax bimaculatus* não correspondia à consideração de uma única espécie, tendo sido então dividido em duas espécies: *Astyanax altiparanae* e *Astyanax bimaculatus* (Garutti e Britski, 2000).

O *Astyanax altiparanae* (lambari do rabo amarelo), pertence à classe actinopterygii, ordem characiformes, e família characidae (Garutti e Britski, 2000).

Espécies do gênero *Astyanax* estão entre os mais importantes componentes da rede alimentar dos rios da América do sul, com uma significativa participação na dieta de grandes peixes (Shibatta et al., 2002). Existem aproximadamente cem espécies e subespécies descritas dentro deste gênero, porém muitos aspectos de sua biologia ainda são desconhecidos.

O lambari é uma espécie que apresenta pequeno porte, atingindo de 7 a 15 cm de comprimento, podendo alcançar 60 gramas de peso. Possui hábito alimentar onívoro e seu crescimento é rápido, chegando à maturidade sexual com cerca de quatro meses de idade em condições de cultivo, normalmente com 7 a 9 cm de comprimento para os machos e 12 a 15 cm de comprimento para as fêmeas (Porto-Foresti et al., 2001).

O dimorfismo sexual em *Astyanax altiparanae* está presente principalmente durante o período reprodutivo, no qual as diferenças morfológicas nítidas ficam mais evidenciadas entre os machos e as fêmeas. Estas, além de serem maiores e possuírem o corpo mais arredondado, são freqüentemente mais precoces no crescimento do que os machos (Porto-Foresti et al., 2005; Sato et al. 2006). Neste período, observa-se ainda nas fêmeas, uma forte irrigação por vasos sanguíneos na região ventral do corpo, principalmente nas bases de inserção das nadadeiras peitorais e ventrais. Os machos são menores, possuem o corpo alongado e, no período reprodutivo, apresentam a nadadeira anal áspera ao toque, sendo tal característica importante para a sua identificação (Porto-Foresti et al., 2005).

Devido à extensa distribuição e o fácil cultivo, o lambari tornou-se uma espécie visada do ponto de vista econômico, sendo utilizada para o consumo direto, para a industrialização na forma de conservas, como alimento de forragem na criação de peixes carnívoros e ainda ser comercializado como isca viva para a pesca esportiva, entre outras possibilidades.

Além disso, apresenta grande importância ecológica, contribuindo para o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos de água doce brasileiros, já que participa de diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar. Contudo, apresenta ainda relevância acadêmica, uma vez que esta espécie tem grande potencial para ser utilizada como modelo biológico de estudos por apresentar diversas características, como ser gerador de prole numerosa, apresentar gerações curtas, ter reprodução fácil, além de ser um ótimo bioindicador de ambientes poluídos, como foi apresentado no I Workshop do Grupo de Pesquisas sobre Efeitos de Xenobióticos na Ictiofauna Brasileira (2008).

1.1.2 *Danio rerio* (Zebrafish)

Deliberamos estudar o *zebrafish* (*Danio rerio*), pertencente à classe actinopterygii, ordem cypriniformes, família cyprinidae (Hamilton, 1822), como base comparativa para os dados obtidos em *Astyanax altiparanae*, já que a maioria das espécies sul americanas, como dito anteriormente, não possui muitas informações científicas publicadas e/ou acessíveis.

O *zebrafish* é um teleosteo de água doce de pequeno porte, tendo em média 5 centímetros, sendo uma espécie originária da Ásia Central. Nas últimas décadas esta espécie se tornou o mais popular modelo alternativo de vertebrados devido a diversas características como pequeno tamanho, fácil cultivo, ciclo de vida curto, sendo que a diferenciação sexual ocorre por volta de 21-42 dias pós-fertilização (Brion et al., 2004), e a maturidade sexual é alcançada aproximadamente aos 90 dias (Von Hofsten e Olsson, 2005). Apresenta também um grande número de descendentes quando comparado com outros organismos modelo, e contínua produção de ovos, o que distingue esta da maioria das outras espécies de peixes, sendo que uma fêmea de *zebrafish* pode chegar a depositar 200 ovos por semana (Dahm et al., 2006).

O desenvolvimento externo e rápido dos embriões também garante o sucesso do modelo em questão, sendo que a embriogênese ocorre em torno de 24 horas e a organogênese é completada depois de 5 dias de desenvolvimento, permitindo a observação de vários aspectos do desenvolvimento, bem como experimentos completos em poucas horas ou dias. Além do mais, o embrião do *zebrafish* é translúcido, o que permite uma fácil visualização dos processos internos do desenvolvimento, como a formação e função dos órgãos (Dahm, 2002). Esta característica também facilita, por exemplo, o acompanhamento da expressão de transgenes marcados com fluorescência e o monitoramento do gene de interesse (por exemplo, GFP, luciferase) bem como permite fazer manipulações a laser (separação ou remoção de células) (Gilmour et al., 2002).

Por fim, todas estas características propiciaram ao *zebrafish* a vanguarda dos estudos de desenvolvimento, fisiologia e genética, entre outros, e por isto, numerosas informações sobre o processo reprodutivo são encontradas na literatura. Estes dados foram de extrema valia neste trabalho para o estabelecimento de parâmetros e comparações com o lambari que, como a maioria das espécies sul americanas, possui poucas informações disponíveis.

1.2 Reprodução

Os peixes apresentam uma grande complexidade reprodutiva, com diferenças anatômicas dos diversos constituintes do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas entre as espécies. As variações vão desde o local do desenvolvimento do embrião, onde muitas espécies têm fertilização externa e outras, fertilização interna, até diferenças nas formas de cuidado com a prole, na construção de ninhos, e, ainda, algumas espécies necessitam migrar para conseguir o sucesso reprodutivo.

Com isso, um grande interesse nos aspectos biológicos relacionados à reprodução de peixes vem sendo despertado, e além do mais, nos últimos anos, as populações naturais desta classe de vertebrados vem sofrendo ameaças, na maioria das vezes por ação antrópica, como foi citado acima. Assim, por estes motivos, estudos nesta área têm aumentado significativamente na última década (Billard, 1989; Zohar et al., 2010; Weltzien et al., 2004).

É sabido que a reprodução é um processo fundamental para a perpetuação das espécies. Para que ocorra o sucesso reprodutivo é necessário que haja uma

combinação de diversos fatores dependentes de uma integração do sistema nervoso com o sistema endócrino. Dentre eles, encontramos os fatores externos como o fotoperíodo, temperatura, alimentação, predadores e sazonalidade, e os fatores internos como a cascata hormonal derivada do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Figura 1).

O primeiro nível desta cascata é liderado pela kisspeptina, um hormônio descoberto recentemente que atua através de seu receptor Kiss1R, presente nos neurônios produtores do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) (Parhar et al., 2004). O controle dos neurônios de GnRH pela kisspeptina é um assunto atual nos estudos da neuroendocrinologia reprodutiva, tendo poucas informações disponíveis em não mamíferos.

Um experimento realizado com *Epinephelus coiodes* demonstrou o papel funcional da kisspeptina sobre os neurônios de GnRH, participando do eixo reprodutivo, no qual a injeção da kisspeptina levou a um aumento do mRNA de *GnRH1* no hipotálamo desta espécie (Shi et al., 2010).

Por sua vez, o GnRH estimula a hipófise a sintetizar e a liberar gonadotropinas (GTHs), que, atuam nas gônadas estimulando a produção de esteróides (Weltzien et al., 2004; Schulz e Goss, 1999).

O hormônio folículo estimulante (FSH) em geral é o primeiro a ser liberado, tendo seus níveis elevados nos primeiros estágios de maturação gonadal, onde estimula a produção de 17β -estradiol, hormônio este que está envolvido na gametogênese e espermatogênese. Por outro lado, o hormônio luteinizante (LH) nestas fases tem seus níveis mais baixos, ou então nulos, aumentando antes da maturação, onde estimulará a secreção de $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17\alpha,20\beta$ DP) e de 11-cetotestosterona, que estão envolvidos no processo de maturação e liberação de gametas (Banerjee e Khan, 2008; Nagahama e Yamashita, 2008).

Outros hormônios estão envolvidos no controle do processo reprodutivo através do estímulo ou inibição do GnRH, e entre eles está a dopamina, um pequeno neurotransmissor que na maioria dos teleósteos inibe a secreção de gonadotropinas diretamente através de receptores nas células hipofisárias (Chang e Peter, 1983), ou, então, indiretamente através de receptores nas terminações nervosas de GnRH da neuro-hipófise ou nos próprios neurônios secretores de GnRH, inibindo a sua liberação (Yu et al., 1991).

O GABA (ácido amino butírico gama) é um neurotransmissor extremamente abundante no encéfalo de todos os vertebrados, onde atua estimulando a secreção de LH e de GnRH (Kah et al., 1992; Sloley et al., 1992) e inibindo a secreção de dopamina (Trudeau, 1997; Trudeau et al., 2000).

O neuropeptídeo Y (NPY) atua estimulando a secreção de hormônio do crescimento (GH) (Peng et al., 1993c), regulando a secreção de gonadotropinas (Breton et al., 1991; Kah et al., 1989; Peng et al., 1993b), e na liberação de GnRH no terminal hipofisário e na região preóptica (Peng et al., 1993a; Trudeau, 1997).

O hormônio inibitório de gonadotropina (GnIH), que foi recentemente identificado em aves (Tsutsui et al., 2007), é um decapeptídeo que atua direto na hipófise inibindo a síntese e liberação de gonadotropinas (Tsutsui et al., 2007; Tsutsui e Ukena, 2006; Yin et al., 2005), além de exercer uma função neuromodulatória nas células de GnRH (Bentley et al., 2006, 2008). A síntese do GnIH é modulada pela melatonina, sugerindo seu papel da tradução de sinais de fotoperíodo para outros centros endócrinos envolvidos no controle da reprodução (Tsutsui et al., 2007).

Como podemos observar, diversos fatores são necessários para que o processo reprodutivo se complete com sucesso. Dentre eles, deliberamos estudar com mais detalhes o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), investigando a distribuição de suas isoformas em áreas encefálicas relacionadas com suas possíveis funções.

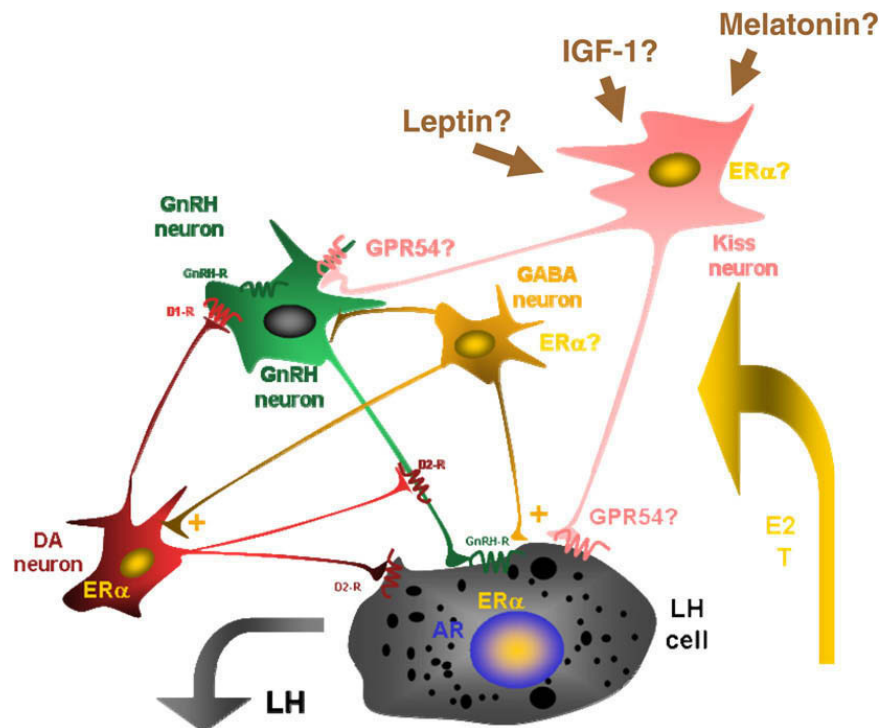


Figura 1. O esquema representa o principal circuito de liberação de gonadotropinas em peixes. GnRH e dopamina (em alguns, mas não em todas as espécies), respectivamente, estimula e inibe a liberação de LH/FSH diretamente nas células gonadotrópicas. Estes efeitos são modulados pelos neurônios produtores de GABA que atuam aumentando a secreção de GnRH e inibindo a secreção de dopamina. Esteróides sexuais modulam a atividade deste circuito diretamente através dos neurônios de dopamina e GABA, e, indiretamente, possivelmente através dos neurônios da Kisspeptina (Kiss). Se os neurônios da Kiss integram a informação com a fotoperiodicidade e o estado nutricional do animal não é sabido ainda, sendo apenas uma hipótese que precisa ser investigada. Fonte: adaptado de Zohar et al. (2010).

1.3 Hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH)

O GnRH é um neuropeptídeo com dez aminoácidos, que foi isolado primeiramente no encéfalo de porcos (Matsuo et al., 1971) e ovelhas (Burgus et al., 1972), o qual recebeu o nome de LHRH (hormônio estimulador do hormônio luteinizante) por estimular o LH. Posteriormente, foi visto que esta molécula também atua na síntese e liberação de FSH recebendo então o nome mais genérico de GnRH.

Iwakoshi et al. (2000) observaram que o GnRH de *Octopus vulgaris*, um invertebrado (Classe Cephalopoda), possui 12 aminoácidos, sendo uma exceção na família do GnRH, porém, todas as formas desta molécula apresentam as posições 1, 4, 9 e 10 altamente conservadas ao longo da evolução (Tabela 1).

Tabela 1 - Estrutura primária das formas de GnRH de vertebrados e invertebrados.
Fonte: adaptado de Kah et al. (2007).

GnRH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Vertebrados											
<i>Mammalian</i> GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH ₂	Matsuo et al., 1971; Burgus et al., 1972
<i>Chicken</i> GnRH-I	-	-	-	-	-	-	-	Gln	-	-	Miyamoto et al., 1983
<i>Rana</i> GnRH	-	-	-	-	-	-	-	Trp	-	-	Yoo et al, 2000
<i>Seabream</i> GnRH	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-	Powell et al., 1994
<i>Salmon</i> GnRH	-	-	-	-	-	-	Trp	Leu	-	-	Sherwood et al., 1983
<i>White fish</i> GnRH-I	-	-	-	-	-	-	Met	Asn	-	-	Adams et al., 2002
<i>Guinea pig</i> GnRH-I	-	Tyr	-	-	-	-	Val	-	-	-	Jimenez-Linan et al., 1997
<i>Medaka</i> GnRH	-	-	-	-	Phe	-	-	Ser	-	-	Okubo et al., 2000; Montaner et al., 2001
<i>Chicken</i> GnRH-II	-	-	-	-	His	-	Trp	Tyr	-	-	Miyamoto et al., 1984
<i>Catfish</i> GnRH	-	-	-	-	His	-	-	Asn	-	-	Ngamvongchon et al., 1992
<i>Herring</i> GnRH	-	-	-	-	His	-	-	Ser	-	-	Carolsfeld et al., 2000
<i>Dogfish</i> GnRH	-	-	-	-	His	-	Trp	Leu	-	-	Lovejoy et al., 1992
<i>Lamprey</i> GnRH III	-	-	-	-	His	Asp	Trp	Lys	-	-	Sower et al., 1993
<i>Lamprey</i> GnRH I	-	-	Tyr	-	Leu	Glu	Trp	Lys	-	-	Sherwood et al., 1986
Invertebrados											
<i>Tunicate</i> GnRH I	-	-	-	-	Asp	Tyr	Phe	-	-	-	Powell et al., 1996
<i>Tunicate</i> GnRH II	-	-	-	-	Leu	Cys	Hys	-	-	-	Powell et al., 1996
<i>Tunicate</i> GnRH III	-	-	-	-	-	Glu	Phe	-	-	-	Adams et al., 2003
<i>Tunicate</i> GnRH IV	-	-	-	-	Asn	Gln	-	-	-	-	Adams et al., 2003
<i>Tunicate</i> GnRH V	-	-	-	-	-	Gln	Tyr	-	-	-	Adams et al., 2003
<i>Tunicate</i> GnRH VI	-	-	-	-	Lys	Gly	Tyr	-	-	-	Adams et al., 2003
<i>Tunicate</i> GnRH VII	-	-	-	-	-	Ala	-	-	-	-	Adams et al., 2003
<i>Tunicate</i> GnRH VIII	-	-	-	-	Leu	Ala	-	-	-	-	Adams et al., 2003
<i>Tunicate</i> GnRH IX	-	-	-	-	Asp	Lys	-	-	-	-	Adams et al., 2003
<i>Tunicate</i> GnRH	-	-	Phe	-	Asp	Gly	Trp	-	-	-	Iwakoshi et al., 2002.

Este neuropeptídeo está diretamente envolvido no processo reprodutivo, no qual basicamente estimula a hipófise a sintetizar e a liberar gonadotropinas (LH e FSH), que, por sua vez, atuam nas gônadas regulando a gametogênese e esteroidogênese (Weltzien et al., 2004; Schulz e Goss, 1999). O modo com que o GnRH alcança as células gonadotrópicas difere entre os teleósteos e os demais vertebrados, sendo que, nestes últimos, o GnRH é liberado na região de eminência média, na qual está localizado um sistema porta-hipofisário (Fink, 1988), que o leva

até as células gonadotrópicas através da corrente sanguínea. Já em teleósteos, o GnRH é liberado nas proximidades das células gonadotrópicas, uma vez que os terminais das fibras dos neurônios hipotalâmicos desembocam nas adjacências das células hipofisárias e, em conjunto, estas fibras formam a neuro-hipófise (Anglade et al., 1993; Yamamoto et al., 1995).

Além da função reprodutiva, o GnRH apresenta funções de neuromodulação com implicações na modulação do comportamento sexual (White et al., 1995; Soga et al., 2005). Participa também do controle da secreção de prolactina, e da liberação de GH pela hipófise (Marchant et al., 1989; Klausen et al., 2002). Além disso, foi visto que o GnRH pode estar envolvido no controle da secreção de somatolactina, sendo que em *Oncorhynchus mykiss* e *Oncorhynchus masou*, o GnRH3 (*salmon* GnRH ou sGnRH) mostrou estimular a síntese de somatolactina nestas espécies (Kakizawa et al., 1997; Onuma et al., 2005a). Em *Cichlasoma dimerus*, foi observado através de dupla marcação o contato próximo das fibras imunorreativas ao GnRH com as células de somatolactina da *pars intermedia* (Cánepa et al., 2008).

Recentemente, Servili et al. (2010), viram que a glândula pineal de *Dicentrarchus labrax* recebe projeções de fibras que partem dos neurônios de GnRH2 localizados no tegumento do encéfalo médio, além de possuir receptores altamente específicos para o GnRH2 (dlGnRHR-II-2b). Estes dados sugerem uma nova função para o GnRH2, e podem ajudar no esclarecimento do mecanismo da modulação da secreção de melatonina, ainda hoje não totalmente compreendido.

Foi visto que o GnRH não está presente apenas no encéfalo, mas também nas gônadas, estando possivelmente envolvido na esteroidogênese, na reinicialização da meiose em fêmeas (Pati e Habibi, 2002), e no controle da proliferação de células germinativas em machos através de apoptose, demonstrando, então, um papel importante também no controle da espermatogênese (Andreu-Vieyra e Habibi, 2001).

Atualmente são encontradas 25 formas diferentes de GnRH entre invertebrados e vertebrados, sendo que nove formas distintas foram isoladas no encéfalo de espécies de peixes (Melamed e Sherwood, 2005).

Em vertebrados, geralmente são encontradas de duas a três formas de GnRH em um único indivíduo, sendo que, entre as espécies, estas formas podem variar na expressão e na localização no encéfalo.

A nomenclatura tradicional deste hormônio é dada pela espécie onde foi isolado pela primeira vez. Atualmente, a terminologia usada é de acordo com a sua localização e função, sendo que a isoforma encontrada na região hipotalâmica ligada à função reprodutiva recebe o nome de GnRH1. A isoforma presente na região do tegumento do encéfalo médio, ligada à função de modulação da melatonina, recentemente proposta por Servili et al. (2010), é chamada de GnRH2, e a isoforma presente no nervo terminal/telencéfalo ventral, e que está relacionada com a função de neuromodulação e função reprodutiva, dependendo da espécie, recebe o nome de GnRH3 (Fernald e White, 1999).

Sabe-se atualmente que os neurônios de GnRH3 apresentam junções GAP entre eles, o que faz destes neurônios um grupo funcionalmente coordenado, com atividade elétrica sincronizada, através da regulação autócrina/parácrina pelo GnRH3 sintetizado. Existe a possibilidade de neurônios de GnRH2 e de GnRH1 também possuírem este tipo de coordenação, porém ainda são necessários mais estudos para esclarecer melhor esta suposição (Haneda e Oka, 2008).

1.3.1 Origem dos neurônios GnRH

O GnRH é sintetizado durante a vida pré e pós-natal (Plant, 2001; Ebling, 2005; Trudeau, 1997), sendo que na vida embrionária, o GnRH3 do nervo terminal começa a ser expresso muito antes do desenvolvimento gonadal, sendo regulado pelos hormônios tireoidianos e testosterona (Soga et al., 1998; Parhar et al., 2000). Já a expressão do GnRH1 hipotalâmico coincide com a diferenciação sexual gonadal (Parhar, 1997; Chiba et al., 1999) e seus neurônios secretores são regulados por estrógenos e cetotestosterona (Soma et al., 1996; Parhar et al., 2000).

O GnRH2 em *European sea bass* é a variante expressa em primeiro lugar durante o desenvolvimento, sendo detectado quatro dias após a eclosão (Gonzalez-Martinez et al., 2004, 2002b). Sua expressão mais precoce também é descrita em outras espécies de vertebrados (Muske e Moore, 1990; White e Fernald, 1998) o que sugere uma importante função para esta variante durante o desenvolvimento.

Segundo Whitlock et al. (2006), a síntese do GnRH durante o desenvolvimento embrionário tem um papel crucial para estabelecer o sistema de GnRH que, posteriormente, na vida adulta, irá ser ativado para dar o início e a manutenção da puberdade. Uma falha na migração dos neurônios de GnRH durante o

desenvolvimento pode levar a algumas síndromes, como a síndrome de Kallman documentada em humanos, na qual a falha de migração afeta, além do sistema de GnRH, o sistema olfatório. Este fato pode indicar a existência de um ponto de união entre o sistema sensorial e o eixo reprodutivo (MacColl et al., 2002).

É conhecido que os neurônios produtores de GnRH1 e de GnRH3 em teleósteos têm origem comum no placode olfatório, assim como descrito em outros vertebrados (Gonzalez-Martinez et al., 2004, 2002b; Kah et al., 2007; Okubo e Nagahama, 2008; Okubo et al., 2006, Schwanzel-Fukuda e Pfaff, 1990; Wray et al., 1989). Esta evidência foi consolidada através de estudo com uma linhagem de medaka transgênico, na qual neurônios de GnRH do encéfalo anterior foram marcados com GFP (*Green Fluorescent Protein*), tendo sido visto que os neurônios de GnRH1 e GnRH3 originam da junção entre o telencéfalo anterior e a região olfatória, migrando durante o desenvolvimento até suas posições finais (Okubo et al., 2006). Já em peixes com duas variantes de GnRH (GnRH3 e GnRH2), como no caso do *zebrafish*, a origem para o GnRH3 é a mesma, ou seja, na região olfatória, ocorrendo posteriormente uma migração destes neurônios através do gânglio do nervo terminal e telencéfalo ventral até a região hipotalâmica. Como se trata de uma espécie com duas variantes de GnRH, o GnRH3 tem sua localização final no hipotálamo e também no gânglio do nervo terminal (Abraham et al., 2008).

Já as células de GnRH2 neuromodulatórias localizadas no encéfalo médio têm origem diferente do GnRH1 e do GnRH3, originando-se da zona endodimal do terceiro ventrículo, uma área de transição entre o encéfalo anterior e médio (Parhar et al., 1996; White e Fernald, 1998).

1.3.2 Aspectos evolutivos

O GnRH é encontrado em tecido neural desde invertebrados, como cnidário (Anctil, 2000) e moluscos (Di Cosmo e Cristo, 1998; Goldberg et al., 1993; Pazos e Mathieu, 1999), como em vertebrados, em peixes agnathas (Sherwood et al., 1986; Sower et al., 1993), elasmobrânquios (Lovejoy et al., 1991b, 1992), teleósteos (Ngamvongchon et al., 1992; Powell et al., 1994, 1997; Weber et al., 1997; Carolsfeld et al., 2000; Montaner et al., 2001; Vickers et al., 2004), anfíbios (Conlon et al., 1993), répteis (Lovejoy et al., 1991a), aves (Miyamoto et al., 1983, 1984) e mamíferos (Kasten et al., 1996; White et al., 1998), indicando que este hormônio é

bem antigo, exercendo suas funções perfeitamente, e deixando claro a sua conservação durante a evolução.

Todos os genes codificantes das diferentes formas de GnRH em vertebrados têm a mesma arquitetura de quatro exons separados por três introns, sendo esta estrutura altamente conservada durante a evolução, apesar das mudanças no tamanho e na sequência dos exons e introns (Kavanaugh et al., 2008).

Em cada gene, o primeiro exon codifica a região não codificante 5' (UTR), o segundo e o terceiro exons codificam o peptídeo sinal, o GnRH decapeptídeo, o lado de clivagem proteolítica e o peptídeo associado ao GnRH (GAP), e o quarto exon codifica o carboxi terminal da GAP e a região não codificante 3' (UTR) (Kavanaugh et al., 2008). Comparações entre os cDNAs precursores codificantes de distintos membros da família de GnRH mostram uma completa conservação do lado de clivagem proteolítico e alta homologia dos decapeptídeos, mas grandes divergências na região da GAP (King e Millar, 1997; Sherwood et al., 1997; Yu et al., 1997) (Figura 2).

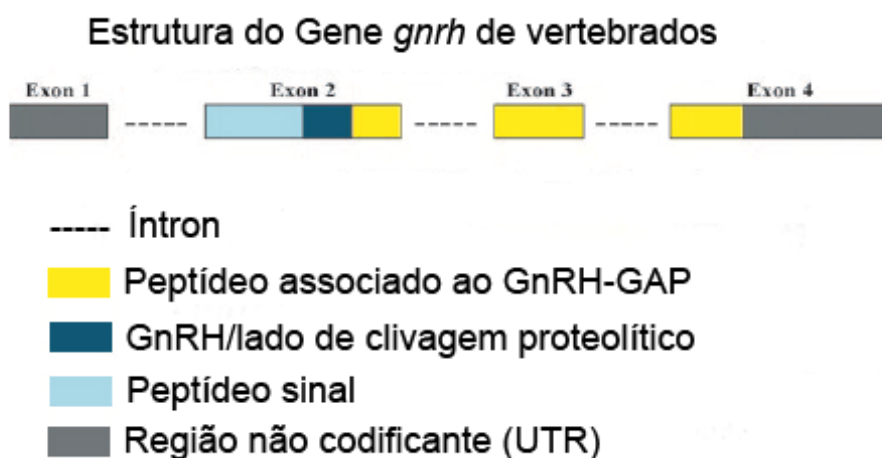


Figura 2. Esquema representando a organização genômica do gene de *GnRH* em vertebrados, que compreende três introns e quatro exons.
Fonte: adaptado de Kavanaugh et al. (2008).

Dentre todas as formas da molécula de GnRH, a mais conservada é a encontrada no encéfalo medial (GnRH2) que está presente em todas as classes de vertebrados (Dubois et al., 2002). Já a forma hipofisiotrópica (GnRH1) possui uma grande variação na sua sequência, bem como na estrutura dos aminoácidos (Montaner et al., 1998, 2002).

A forma encontrada no nervo terminal, a qual foi originalmente isolada em salmão (GnRH3), é praticamente exclusiva de peixes, embora tenha sido documentado recentemente que esta forma está presente em alguns mamíferos (Montaner et al., 1998; Parhar et al., 2005). Porém, a classificação das diferentes isoformas de GnRH ainda está em andamento, uma vez que novas isoformas continuam a ser descobertas, restando ainda examinar GnRHs de muitas espécies.

O padrão evolutivo das formas de GnRH tem sido proposto principalmente com base na estrutura primária e na distribuição filogenética deste decapeptídeo em numerosas espécies. Estes estudos têm mostrado que a maioria dos vertebrados tem de duas a três formas de GnRH no encéfalo (Sherwood et al., 1997; King e Millar, 1997).

Segundo Senthilkumaran et al. (1999), todos os vertebrados contêm GnRH-II de aves (cGnRH-II) (atual GnRH2) expresso no tegumento do encéfalo médio. O segundo tipo de GnRH encontrado no encéfalo de alguns teleósteos ancestrais como a enguia e o peixe borboleta é o GnRH de mamífero (mGnRH) (atual GnRH3) (King et al., 1990; O'Neil et al., 1998). A presença de mGnRH é uma característica compartilhada com anfíbios, mamíferos e ancestrais de peixes ósseos que evoluíram antes dos teleósteos (Sherwood et al., 1997; Joss et al., 1994; Lescheid et al., 1995). Outros teleósteos primitivos e teleósteos que evoluíram posteriormente possuem GnRH do tipo salmão (sGnRH/GnRH3), ao invés de mGnRH como segunda forma (Sherwood et al., 1997; King e Millar, 1997; O'Neil et al., 1998). Interessantemente, a terceira forma de GnRH tem sido identificada em alguns teleósteos que evoluíram posteriormente. Estas espécies possuem o cGnRH-II (ou GnRH2), o sGnRH (ou GnRH3), e a terceira forma (ou GnRH1) que é peculiar para cada espécie, como por exemplo, *seabream* GnRH (sbGnRH) para percas e characiformes, *herring* GnRH (hrGnRH) para sardinha, ou medaka GnRH (mdGnRH) para medaka (Powell et al., 1994; White et al., 1995; Carolsfeld et al., 2000; Okubo et al., 2000). Independentemente do tipo, o GnRH1 é sempre expresso na área préóptica encefálica, onde as fibras de GnRH se projetam para a hipófise (Powell et al. 1994, 1995; White et al., 1995; Golthilf et al., 1996; Parhar et al., 1998).

Uma hipótese para explicar o fato da presença de duas ou três formas de GnRH por espécie seria a duplicação de um gene ancestral de *GnRH* que deu origem ao *GnRH1* e *GnRH2* antes mesmo da separação entre vertebrados e invertebrados. Posteriormente à separação entre espécies de peixes de nadadeiras

raiadadas e de nadadeiras lobadas (que evolutivamente deram origem a humanos e aves), o *GnRH1* ancestral se duplicou dando origem ao *GnRH1* e *GnRH3*. Em algumas linhagens de nadadeiras lobadas o *GnRH3* foi perdido, as quais nos dias atuais apresentam os genes de *GnRH1* e *GnRH2*. Já em linhagens de nadadeiras raiadas, algumas perderam o *GnRH1*, apresentando apenas *GnRH2* e *GnRH3*, e outras continuam com as três formas de *GnRH* (Figura 3) (Kuo et al., 2005).

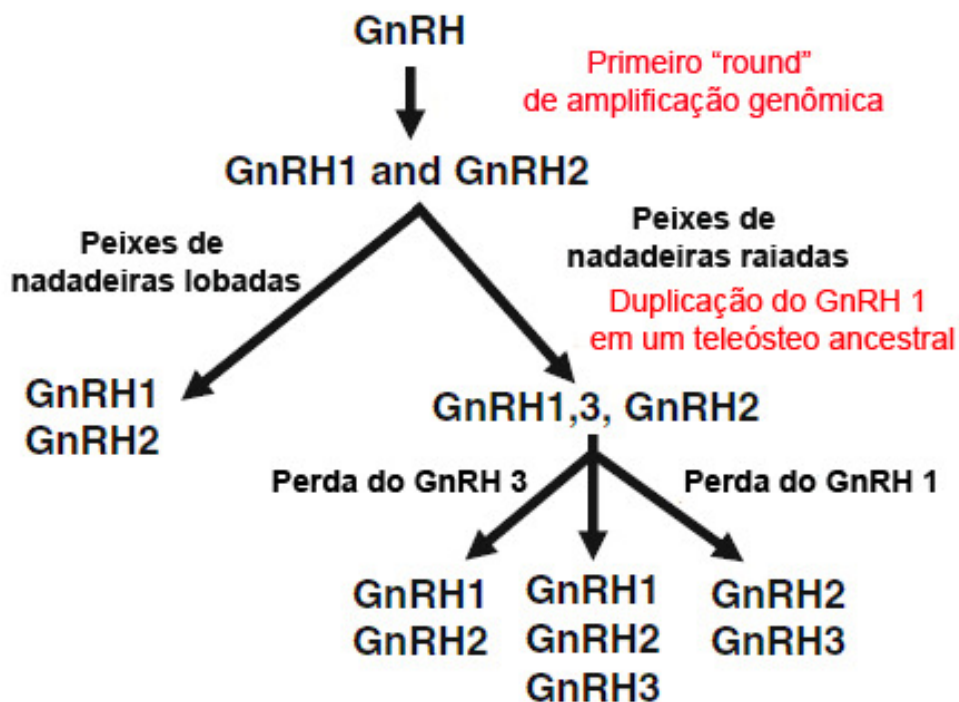


Figura 3. Este esquema exemplifica um novo modelo de relação evolucionária dos genes de *GnRH*. Como podemos observar, existem dois genes ancestrais de *GnRH* que estão presentes e foram mantidos em tetrápodes. Em teleósteos, o *GnRH1* foi duplicado dando origem ao *GnRH3*. Estes três genes foram mantidos em algumas espécies de peixes, porém perdidos em outras.

Fonte: adaptado de Kuo et al., 2005).

1.3.3 GnRH em teleósteos

Poucos são os estudos realizados sobre as formas de GnRHs presentes em espécies de teleósteos sul americanos, excetuando-se o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Powell et al., 1997), curimatá (*Prochilodus lineatus*) (Somoza et al., 1994) e *Cichlasoma dimerus* (Pandolfi et al., 2005). Entretanto, não são

conhecidos até hoje, trabalhos que mostrem a distribuição destas moléculas nas diferentes regiões encefálicas destes animais, exceto com *Cichlasoma dimerus*, no qual, através do uso de anticorpos e ribossondas para proteína acoplada ao GnRH, foi identificada a localização do prepro-GnRH de salmão, de *seabream* e de aves do tipo II (prepro-GnRH 1, 2 e 3). Em *zebrafish*, porém, já foi demonstrada a presença das duas formas de GnRH nesta espécie, mas não com estudos imunohistoquímicos.

1.3.3.1 GnRH em lambari

Em *Astyanax altiparanae* não foi encontrado nenhum estudo relacionado ao hormônio liberador de gonadotropinas. Na literatura aparecem apenas dados obtidos em peixes (curimatá e pacu) pertencentes à mesma ordem Characiformes.

No curimatá (*Prochilodus lineatus*) foram encontradas duas formas distintas de GnRH: GnRH de aves (cGnRH-II/GnRH2) e GnRH de salmão (sGnRH/GnRH3), detectadas através de métodos de radioimunoensaio (RIA) e cromatografia líquida de alta performance (HPLC). É possível que exista uma terceira forma ainda não identificada (Somoza et al., 1994). Não foi encontrado GnRH2 no extrato de hipófise, indicando que esta forma de GnRH provavelmente não está ligada à função reprodutiva, e talvez tenha um papel de neurotransmissor ou de neuromodulador.

Powell et al. (1997) encontraram três formas de GnRH no encéfalo de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) que também pertence à mesma ordem do lambari. Estas formas são: GnRH de perca (*seabream*) (sbGnRH/GnRH1), cGnRH-II (GnRH2) e sGnRH (GnRH1). O sbGnRH (GnRH1) é encontrado também em várias outras espécies de percas.

1.3.3.2 GnRH em *zebrafish*

Como dito anteriormente, o *zebrafish* tem se tornado uma importante ferramenta para estudos de desenvolvimento e genética. Com isso, muitos genes desta espécie foram isolados recentemente, permitindo estudos evolutivos (Chiang et al., 2001; Postlethwait et al., 2000). Junto a estes, foram clonados dois genes de *GnRH* do *zebrafish* (Steven et al., 2003; Torgersen et al., 2002), e suas expressões

foram vistas no bulbo olfatório-nervo terminal (GnRH3) e encéfalo médio (GnRH2) (Steven et al., 2003 e Whitlock et al., 2003).

Análises por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) também revelaram a presença de sGnRH e cGnRH-II no encéfalo de *zebrafish* (Powell et al., 1996) e estudos com hibridização *in situ* e ELISA também foram realizados para o sGnRH e o cGnRH-II em *zebrafish* adultos (Steven et al., 2003) A maioria dos estudos existentes sobre GnRH em *Danio rerio* foram realizados em larvas e embriões (Abraham et al., 2008; Palevitch et al., 2009; Kuo et al., 2005).

6 CONCLUSÕES

6.1 Através do método de imuno-histoquímica e reação em cadeia da polimerase (PCR) foi confirmada a presença de GnRH em *Astyanax altiparanae*, assim com em *zebrafish*.

6.2 A distribuição do GnRH encontrada em *Astyanax altiparanae* e em *zebrafish* correspondem ao padrão encontrado na literatura.

6.3 O GnRH presente nas áreas encefálicas ligadas à reprodução e hipófise em *Astyanax altiparanae* foi o GnRH3, indicando a sua possível participação no controle da reprodução.

REFERÊNCIAS*

Abraham E, Palevitch O, Ijiri S, Du SJ, Gothilf Y, Zohar Y. Early development of forebrain gonadotrophin-releasing hormone(GnRH) neurones and the role of GnRH as an autocrine migration factor. *J Neuroendocri.* 2008;20:394-405.

Adams BA, Vickers ED, Warby C, Park M, Fischer WH, Grey Craig A, Rivier JE, Sherwood NM. Three forms of gonadotropin-releasing hormone, including a novel form, in a basal salmonid, *Coregonus clupeaformis*. *Biol Reprod.* 2002;67:232-239.

Adams BA, Tello JA, Erchegyi J, Warby C, Hong DJ, Akinsanya KO, Mackie GO, Vale W, Rivier JE, Sherwood NM. Six novel gonadotropin-releasing hormones are encoded as triplets on each of two genes in the protochordate, *Ciona intestinalis*. *Endocrinology.* 2003;144:1907-1919.

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

Ancil M. Evidence for gonadotropin-releasing hormone-like peptides in a cnidarian nervous system. *Gen Comp Endocrinol.* 2000;119:317-328.

Andreu-Vieyra CV, Habibi HR. Effects of salmon GnRH and chicken GnRH-II on testicular apoptosis in goldfish *Carassius auratus*. *Comp Biochem Physiol.* 2001;129 (Pt B):483-487.

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

Banerjee A, Khan IA. Molecular cloning of FSH and LH b subunits and their regulation by estrogen in Atlantic croaker. *Gen Comp Endocrinol.* 2008;155:827-837.

Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Osugi T, Ukena K, O'Brien S, Perfito N, Moore IT, Tsutsui K, Wingfield J. C. Interactions of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in birds and mammals. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.* 2006;305:807-814.

Bentley GE, Ubuka T, McGuire NL, Chowdhury VS, Morita Y, Yano T, Hasunuma T, Binns M, Wingfield JC, Tsutsui K. Gonadotropin inhibitory hormone and its receptor in the avian reproductive system. *Gen Comp Endocrinol.* 2008;156:34-43.

Billard R. Endocrinology and fish culture. *Fish Physiol Biochem.* 1989;7:49-58.

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmeje.org>[2007May22].

Breton B, Mikolajczyk T, Popek W, Bieniarz K, Epler P. Neuropeptide Y stimulates in vivo gonadotropin secretion in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol.* 1991;84:277-283.

Brion F, Tyler CR, Palazzi X, Laillet B, Porcher JM, Garric J, Flammarion P. Impacts of 17 β -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo larval, juvenile and adult life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology.* 2004;68:193-217.

Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellos R, Blackwell R, Vale W, Guillemin R. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation). *Proc Natl Acad Sci.* 1972;69:278-82.

Cánepa MM, Pozzi AG, Astola A, Maggese MC, Vissio PG. Effect of salmon melanin-concentrating hormone and mammalian gonadotrophin releasing hormone on somatolactin release in pituitary culture of *Cichlasoma dimerus*. *Cell Tissue Res.* 2008;333:49-59.

Carolsfeld J, Powell JF, Park M, Fischer WH, Craig AG, Chang JP, Rivier JE, Sherwood NM. Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, from an ancient teleost, herring. *Endocrinology.* 2000;141:505-512.

Chang JP, Peter RE. Effects of dopamine on gonadotropin release in female goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology.* 1983;36:351-357.

Chiang EF, Yan YL, Guiguen Y, Postlethwait J, Chung B. Two Cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Mol Biol Evol.* 2001;18:542-550.

Chiba H, Nakamura M, Iwata M, Sakuma Y, Yamauchi K, Parhar IS. Development and differentiation of gonadotropin hormone-releasing hormone neuronal systems and testes in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Gen Comp Endocrinol.* 1999;114:449-459.

Chen CC, Fernald RD. Distributions of two gonadotropin-releasing hormone receptor types in a Cichlid fish suggest functional specialization. *J Comp Neurol.* 2006;495:314-326.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt Biochem.* 1987;162(1):156-159

Conlon JM, Collin F, Chiang YC, Sower SA, Vaudry H. Two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone from the brain of the frog, *Rana ridibunda*: purification, characterization, and distribution. *Endocrinology.* 1993;132:2117-2120.

Dahm R. Atlas of embryonic stages of development in the zebrafish. In: Nusslein-Volhard C, Dahm R. Zebrafish: A practical approach. Oxford: Oxford University Press; 2002. p. 219-236.

Dahm R, Geisler R. Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Marine Biotech.* 2006;8:329-345.

David GS, Carvalho ED, Novaes JLC, Biondi G. A tilápia do rio Tietê-Desafios e contradições da pesca artesanal de tilápias nos reservatórios hipereutróficos do médio rio Tietê. *Revista Panorama da Aqüicultura.* 2006;16:97.

Di Cosmos A, Cristo C. Neuropeptidergic control of the optic gland of *Octopus vulgaris*: FMRF-amide and GnRH immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 1998;398:1-12.

Dubois EA, Zandbergen MA, Peute J, Goss HJ. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain Res Bull.* 2002;57:413-418.

Ebling FJP. The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction.* 2005;129:675-683.

Fernald RD, White RB. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Front Neuroendocrinol.* 1999;20:224-240.

Fink G. Gonadotropin secretion and its control. In: Knobil E, Neill J. *The Physiology of Reproduction.* New York: Raven Press; 1988. p.1349-1377.

Gilmour DT, Jessen JR, Lin S. Manipulating gene expression in the zebrafish. In: Nüsslein-Volhard C, Dahm R. *Zebrafish, a practical approach.* Oxford: Oxford in Press. 2002. v. 5. p.121-143.

Garutti V, Britski HA. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações gerais sobre as demais espécies do gênero na bacia. *Comum Mus Ciênc Tecnol PUCRS Sér Zool.* 2000;13:65-88.

Goldberg JI, Garofalo R, Price CJ, Chang JP. 1993. Presence and biological activity of a GnRH-like factor in the nervous system of *Helisoma trivolvis*. *J Comp Neurol.* 1993;336:571-582.

Golthilf Y, Munoz-Cueto JA, Sagrillo CA, Selmanoff M, Chen TT, Elizur OKA, Zohar Y. Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Spaurus aurata*): complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. *Biol Reprod.* 1996;55:636-645.

Gomez-Segade P, Anadon R. Specialization in the diencephalon of advanced teleosts. *J Morphol.* 1988;197:71-103.

Gonzalez-Martinez D, Madigou T, Zmora N, Anglade I, Zanuy S, Zohar Y, Elizur A, Munoz-Cueto AJ, Kah O. Differential expression of three different prepro-GnRH (gonadotropin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Comp Neurol*. 2001;429:144-155.

Gonzalez-Martinez D, Zmora N, Mananos E, Saligaut D, Zanuy S, Zohar Y, Elizur A, Kah O, Munoz-Cueto AJ. Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs in the brain and pituitary of the European seabass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides. *Comp Neurol*. 2002a;446:95-113.

Gonzalez-Martinez D, Zmora N, Zanuy S, Sarasquete C, Elizur A, Kah O, Munoz-Cueto JA. Developmental expression of three different prepro-GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Chem Neuroanat*. 2002b;23:255-267.

Gonzalez-Martinez D, Zmora N, Saligaut D, Zanuy S, Elizur A, Kah O, Munoz-Cueto, JA. New insights in developmental origins of different GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) systems in perciform fish: an immunohistochemical study in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Chem Neuroanat*. 2004;28:1-15.

Habibi HR, DeLeeuw R, Nahorniak CS, Goos HJT, Peter RE. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor activity in goldfish and catfish: seasonal and gonadal effects. *Fish Physiol Biochem*. 1989;7:109-118.

Hamilton F. An Account of the fishes found in the river Ganges and its branches. Archibald constable and company; 1822. p. 324-400.

Haneda K, Oka Y. Coordinated synchronization in the electrically coupled network of terminal nerve gonadotropin-releasing hormone neurons as demonstrated by double patch-clamp study. *Endocrinology*. 2008;149:3540-354.

Idler DR, Schmidt PJ, Ronald AP. Isolation and identification of 11-ketotestosterone in salmon plasma. *Can J Biochem Physiol*. 1960;38:1053-1057.

Iwakoshi E, Takuwa-Kuroda K, Fujisawa Y, Hisada M, Ukena K, Tsutsui K, Minakata H. Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;291:1187-1193.

Jimenez-Linan M, Rubin BS, King JC. Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain. *Endocrinology*. 1997;138:4123-4130.

Joss JMP, King JA, Millar RP. Identification of molecular form of and steroid response to gonadotropin releasing hormone in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Gen Comp Endocrinol*. 1994;96:392-400.

Kah O, Breton B, Dulka JG, Nunez-Rodríguez J, Peter RE, Corrigan A, Rivier JE, Vale WW. A reinvestigation of the GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) systems in the goldfish brain using antibodies to salmon Gn-RH. *Cell Tissue Res.* 1986;244:327-337.

Kah O, Danger JM, Dubourg P, Pelletier G, Vaudry H, Calas A. Characterization, cerebral distribution and gonadotrophin-release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiol Biochem.* 1989;7:69-76.

Kah O, Trudeau VL, Sloley BD, Chang JP, Dubourg P, Yu KL, Peter RE. Influence of GABA on gonadotrophin release in the goldfish. *Neuroendocrinology.* 1992;55:396-404.

Kah O, Lethimonier C, Somoza G, Guilgur LG, Vaillant C, Lareyre JJ. GnRH and GnRH receptors in metazoa: A historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol.* 2007;153:346-364.

Kakizawa S, Kaneko T, Hirano T. Effects of hypothalamic factors on somatolactin secretion from the organocultured pituitary of rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol.* 1997;105:71-78.

Kasten TL, White SA, Norton TT, Bond CT, Adelman JP, Fernald RD. 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.* 1996;104:7-19.

Khan IA, Thomas P. GABA exerts stimulatory and inhibitory influences on gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Neuroendocrinology.* 1999;69:261-268.

Kavanaugh SI, Nozaki M, Sower SA. Origins of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in vertebrates: identification of a novel GnRH in a basal vertebrate, the sea lamprey. *Endocrinology.* 2008;149:3860-3869.

King JA, Dufour S, Fontaine YA, Millar RP. Chromatographic and immunological evidence for mammalian GnRH and chicken GnRH II in eel (*Anguilla anguilla*) brain and pituitary. *Peptides.* 1990;11:507-514.

King JA, Millar RP. Coordinated evolution of GnRHs and their receptors. In: Pahar IS, Sakuma Y. *GnRH Neurons: Gene to Behavior.* Brain Shuppan; 1997. p. 51-57.

Kitahashi T, Sato H, Sakuma Y, Parhar IS. Cloning and functional analysis of promoters of three GnRH genes in a cichlid. *Bioch Biophys Res Comm.* 2005;336:536-543.

Klausen C, Chang JP, Habibi HR. Time and dose-related effects of expression in the goldfish pituitary. *Can J Physiol Pharmacol Rev.* 2002;80:915-924.

Kobayashi M, Stacey NE. Effects of ovariectomy and steroid hormone implantation on serum gonadotropin levels in female goldfish. *Zool Sci* 1990;7:715-721.

Kuo MW, Lou SW, Postlethwait J, Chung BC. Chromosomal organization, evolutionary relationship, and expression of zebrafish GnRH family members. *J Biom Sci.* 2005;12:629-639.

Larsen DA, Swanson P. Effects of gonadectomy on plasma gonadotropins I and II in Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1997;108:152-160.

Lescheid DW, Powell DFF, Fisher WH, Park M, Craig A, Bukovskaya O, Barannikova IA, Sherwood NM. Mammalian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) identified by primary structure in Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedti*. *Regul. Peptides.* 1995;55:299-309.

Lowe-McConnell RH. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. São Paulo: Edusp; 1999. p. 535.

Lovejoy DA, Sherwood NM, Fischer WH, Jackson BC, Rivier JE, Lee T. Primary structure of gonadotropin-releasing hormone from the brain of a holocephalan (ratfish: *Hydrolagus colliei*). *Gen Comp Endocrinol.* 1991a;82:152-161.

Lovejoy DA, Sherwood NM, Fischer WH, Jackson BC, Rivier JE, Lee T. Primary structure of gonadotropin-releasing hormone from the brain of a holocephalan (ratfish: *Hydrolagus colliei*). *Gen Comp Endocrinol.* 1991b;82:152-161.

Lovejoy DA, Fischer WH, Ngamvongchon S, Craig AG, Nahorniak CS, Peter RE, Rivier JE, Sherwood NM. Distinct sequence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH evolution. *Proc Natl Acad Sci.* 1992;89:6373-6377.

MacColl G, Quinton R, Bouloux PM. GnRH neuronal development: insights into hypogonadotrophic hypogonadism. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13:112-118.

Marchant TA, Chang JP, Nahorniak CS, Peter RE. Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish. *Endocrinology.* 1989;124:2509-2518.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun.* 1971;43:1334-1339.

Melamed P, Sherwood MN. Gonadotropin-releasing hormone in fish: evolution, expression and regulation of the GnRH gene. In: Sherwood MN, Adams AB.

Hormones and their receptors in fish reproduction: molecular aspects of fish and marine biology. 2005. v. 4. p.3-39.

Miyamoto K, Hasegawa Y, Igarashi M, Chino N, Sakakibara S, Kangawa K, Matsuo H. Evidence that chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone is [Gln8]-LH-RH. *Life Sci.* 1983;32:1341-1347.

Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, Matsuo H. 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.* 1984;81:3874-3878.

Mohamed JS, Thomas P, Khan IA. Isolation, cloning and expression of the three prepro GnRH mRNAs in Atlantic croaker brain and pituitary. *J Comp Neurol.* 2005;488:384-395.

Montaner AD, Somoza GM, King JA, Bianchini JJ, Bolis CG, Affanni JM. Chromatographic and immunological identification of GnRH (gonadotropin-releasing hormone) variants. Occurrence of mammalian and a salmon-like GnRH in the forebrain of a eutherian mammal: *Hydrochaeris hydrochaeris* (Mammalia, Rodentia). *Regul. Peptides.* 1998;73:197-204.

Montaner AD, Park M, Fischer WH, Craig AG, Chang JP, Somoza GM, Rivier JE, Sherwood NM. Primary structure of a novel gonadotropin-releasing hormone in the brain of a teleost, pejerrey. *Endocrinology.* 2001;142:1453-1460.

Montaner AD, Mongiat L, Lux-Lantos VA, Warby C, Chewpoy B, Bianchi MS, Libertun C, Rivier JE, Sherwood NM, Somoza GM. Guinea Pig gonadotropin-releasing hormone: Expression pattern, characterization and biological activity in rodents. *Neuroendocrinology.* 2002;75:326-338.

Muske LE, Moore FL. Ontogeny of immunoreactive gonadotropin releasing hormone neuronal systems in amphibians. *Brain Res.* 1990;534:177-187.

Nagahama Y, Hirose K, Young G, Adachi S, Suzuki K, Tamaoki BI. Relative in vitro effectiveness of 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one and other pregnene derivatives on germinal vesicle breakdown in oocytes of ayu (*Plecoglossus altivelis*), amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*), rainbow trout (*Salmo gairdneri*), and goldfish (*Carassius auratus*). *Gen Comp Endocrinol.* 1983;51:15-23.

Nagahama Y, Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish. *Develop Growth Differ.* 2008;50:195-219.

Ngamvongchon S, Lovejoy DA, Fischer WH, Craig AG, Nahorniak CS, Peter RE, Rivier JE, Sherwood NM. Primary structures of two forms of gonadotropin-releasing

hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Mol Cell Neurosci*. 1992;3:17-22.

Northcutt RG, Plassmann W, Holmes PH, Saidel WM. A pallial visual area in the telencephalon of the bony fish *Polypterus*. *Brain Behav Evol*. 2004;64:1-10.

Northcutt RG. Forebrain evolution in bony fishes. *Brain Res Bull*. 2008;75:191-205.

Ogawa S, Soga T, Sakuma Y, Parhar IS. Modulation of GnRH subtypes by social stress and aggressive behavior. *Fish Physiol Biochem*. 2003;28:49-50.

O'Neill DF, Powell JFF, Standen EM, Youson JH, Warby CM, Sherwood NW. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ancient teleosts, the bonytongue fishes: putative origin of salmon GnRH. *Gen Comp Endocrinol*. 1998;112:415-425.

Onuma T, Ando H, Koide N, Okada H, Urano A. Effects of salmon GnRH and sex steroid hormones on expression of genes encoding growth hormone/prolactin/somatolactin family hormones and a pituitary-specific transcription factor in masu salmon pituitary cells *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol*. 2005a;143:129-141.

Onuma T, Higa M, Ando H, Ban M, Urano A. Elevation of gene expression for salmon gonadotropin releasing hormone in discrete brain loci of prespawning chum salmon during upstream migration. *J Neurobiol*. 2005b;63:126-145.

Oka Y. Three types of gonadotrophin-releasing hormone neurones and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurones in teleosts. *J Neuroendocrinol*. 2009;21:334-338.

Okubo K, Suetake H, Usami T, Aida K. Molecular cloning and tissue-specific expression of a gonadotropin-releasing hormone receptor in the Japanese eel. *Gen Comp Endocrinol*. 2000;19:181-192.

Okubo K, Aida K. Gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) in the primitive teleost, the Arowana: phylogenetic evidence that three paralogous lineages of GnRH occurred prior to the emergence of teleost. *Gen Comp Endocrinol*. 2001;124:125-133.

Okubo K, Sakai F, Lau EL, Yoshizaki G, Takeuchi Y, Naruse K, Aida K, Nagahama Y. Forebrain gonadotropin-releasing hormone neuronal development: Insights from transgenic medaka and the relevance to X-linked Kallmann syndrome. *Endocrinology*. 2006;147:1076-1084.

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

Palevitch O, Abraham E, Borodovsky N, Levkowitz G, Zohar Y, Gothilf Y. Nasal embryonic LHRH factor plays a role in the developmental migration and projection of gonadotropin-releasing hormone 3 neurons in zebrafish. *Dev Dyn*. 2009;238:66-75.

Palmiere G, Acone F, Desantis S, Corrieri A, Ventriglia G, Addis O, Genovese S, Aprea A, Spedicato D, Losurdo M, Deflorio M, Di Summa A, De Metro G. Brain morphology and immunohistochemical localization of the gonadotropin-releasing hormone in the bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. Eur J Histochem. 2008;52:19-28.

Pandolfi M, Muñoz-Cueto J A, Lo Nostro FL, Downs JL, Paz DA, Maggaese MC, Urbanski HF. GnRH systems of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae) revisited: a localization study with antibodies and riboprobes to GnRH-associated peptides. Cell Tissue Res. 2005;321:219-132.

Parhar IS, Pfaff DW, Schwanzel-Fukuda. Gonadotropin-releasing hormone gene expression in teleosts. Mol Brain Res. 1996;41:216-227.

Parhar IS. GnRH in tilapia: three genes, three origins and their roles. In: Parhar IS, Sakuma Y. GnRH neurons, gene to behavior. Brain Shuppan. 1997. p.99-122.

Parhar IS, Soga T, Ishigawa Y, Nagahama Y, Sakuma Y. Neurons synthesizing gonadotropin-releasing hormone mRNA subtypes have multiples developmental origins in the medaka. J Comp Neurol. 1998;401:217-226.

Parhar IS, Soga T, Sakuma T. Thyroid hormone and estrogen regulate brain region-specific messenger ribonucleic acids encoding three gonadotropin-releasing hormone genes in sexually immature male fish, *Oreochromis niloticus*. Endocrinology. 2000;141(5):1618-1626.

Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y. Laser-captured single digoxigenin- labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (Gpr54) during maturation in cichlid fish. Endocrinology. 2004;145(8):3613-3618.

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

Pati D, Habibi HR. Involvement of protein kinase C and arachidonic acid pathways in the gonadotropin-releasing hormone regulation of oocyte meiosis and follicular steroidogenesis in the goldfish ovary. Biol Reprod. 2002;66:813-822.

Pazos AJ, Mathieu M. Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: stimulation of gonial DNA synthesis. Gen Comp Endocrinol. 1999;113:112-120.

Peng C, Chang JP, Yu KL, Wong AO, Van Goor F, Peter RE, Rivier JE. Neuropeptide-Y stimulates growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish pituitary: involvement of both presynaptic and pituitary cell actions. Endocrinology. 1993a;132:1820-1829.

Peng C, Humphries S, Peter RE, Rivier JE, Blomqvist AG, Larhammar D. Actions of goldfish neuropeptide Y on the secretion of growth hormone and gonadotropin-II in female goldfish. *Gen Comp Endocrinol.* 1993b;90:306-317.

Peng C, Trudeau VL, Peter RE. Seasonal variation of neuropeptide Y actions on growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish: effects of sex steroids. *J Neuroendocrinol.* 1993c;5:273-280.

Plant TM. Neurobiological bases underlying the control of the onset of puberty in the rhesus monkey: a representative higher primate. *Front Neuroendocrinol.* 2001;22:107-139.

Pham KX, Amano M, Amiya N, Kurita Y. Immunohistochemical localization of three GnRHs systems in brain and pituitary of Japanese Flounder. *Fish Sci.* 2007;73:1113-1122.

Porto-Foresti F, Oliveira C, Foresti F, Castilho-Alameida RB. Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. *Pan Aquicult.* 2001;11(67):15-19.

Porto-Foresti F, Castilho-Almeida RB, Foresti F. Biologia e criação do lambari-dorabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). In: *Espécies Nativas para Piscicultura*. Santa Maria: Ed UFMS. 2005. p.468.

Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, Huang H, Hill-Force A, Talbot WS. Chromosomes zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate. *Genome Res.* 2000;10:1890-1902.

Powell JFF, Zohar Y, Elizur A, Park M, Fischer WH, Craig AG, Rivier JE, Lovejoy DA, Sherwood NM. Three forms of a gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91:12081-12085.

Powell JFF, Fischer WH, Park M, Craig AG, Rivier JE, White SA, Francis RC, Fernald RD, Licht P, Warby C, Sherwood NM. Primary structure of a solitary form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in cichlid pituitary; three forms of GnRH in brain of cichlid and pumpkinseed fish. *Regul Peptides.* 1995;57:43-53.

Powell JFF, Krueckl PM, Collins PM. Molecular forms of GnRH in three model fishes: rockfish, medaka and zebrafish. *J Endocrinol.* 1996;150:17-23.

Powell JFF, Strandén EM, Carolsfeld J, Borella MI, Gazola R, Fischer HW, Park M, Craig GA, Warby MC, Rivier EJ, Val-Sella VM, Sherwood MN. Primary structure of three forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the pacu brain. *Regul. Peptides.* 1997;68:189-195.

Puchtler H, Waldrop FS, Meloan SN, Terry MS, Conner HM. Methacarn (methanol-Carnoy) fixation. Practical and theoretical considerations. *Histochemie*. 1970;21:97-116.

Reperant J, Rio JP, Miceli D, Amouzou M, Peyrichoux J. The retinofugal pathways in the primitive African bony fish *Polypterus senegalus* (Cuvier 1829). *Brain Res*. 1982;217:225-243.

Rupp B, Wulliman MF, Reicherd H. The zebrafish brain: a neuroanatomical comparison with the goldfish. *Anat Embryol*. 1996;194:187-203.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press;1989.

Sato Y, Sampaio EV, Fenerich-Verani N, Verani JR. Biologia reprodutiva de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. *Rev Bras Zool*. 2006;23(1):267-273.

Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. The migration of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neurons from the medial olfactory placode into the medial basal forebrain. *Experientia*. 1990;46:956-962.

Schulz RW, Goos HJT. Puberty in male fish: concepts and recent developments with special reference to the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*. 1999;177:5-12.

Senthilkumaran B, Okuzawa K, Gen Ookura T, Kagawa H. Distribution and seasonal variations in levels of three native GnRH in the brain and pituitary of perciform fish. *J Neuroendocrinol*. 1999;11:181-186.

Servili A, Lethimonier C, Jacques Lareyre J, Lopez-Olmeda JF, Sanchez-Vazquez FJ, Kah O, Munoz-Cueto JA. The highly conserved gonadotropin-releasing hormone-2 form acts as a melatonin-releasing factor in the pineal of a teleost fish, the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Endocrinology*. 2010;151(5):2265-2275.

Sherwood N, Eiden L, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci*. 1983;80:2794-2798.

Sherwood NM, Sower SA, Marshak DR, Fraser BA, Brownstein MJ. Primary structure of gonadotropin releasing hormone from lamprey brain. *J Biol Chem*. 1986;261:4812-4819.

Sherwood NM, Von Schalburg K, Lescheid DW. Origin and evolution of GnRH in vertebrates and invertebrates. In: Parhar, IS, Sakuma Y. *GnRH Neurons: Gene to behavior*. Brain Shuppan;1997. p.3-25.

Shi Y, Zhang Y, Li S, Liu Q, Lu D, Liu M, Meng Z, Cheng CHK, Liu X, Lin H. Molecular identification of the Kiss2/Kiss1ra system and its potential function during 17alpha-methyltestosterone-induced sex reversal in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. Biol Reprod. 2010;83(1):63-74.

Shibatta OA, Orsi ML, Bennemann ST, Silva-Souza AT. Diversidade e distribuição de peixes na bacia do rio Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA. A bacia do rio Tibagi. Londrina. 2002. p.399-419.

Sloley BD, Kah O, Trudeau VL, Dulka JG, Peter RE. Amino acid neurotransmitters and dopamine in brain and pituitary of the goldfish: involvement in the regulation of gonadotropin secretion. J Neurochem. 1992;58:2254-2262.

Soga T, Sakuma Y, Parhar IS. Testosterone differentially regulates expression of GnRH messenger RNAs in the terminal nerve, preoptic and midbrain of male tilapia. Mol Brain Res. 1998;60:13-20.

Soga T, Ogawa S, Millar RP, Sakuma Y, Parhar IS. Localization of the three GnRH types and GnRH receptors in the brain of a cichlid fish: insights into their neuroendocrine and neuromodulator functions. J Comp Neurol. 2005;487:28-41.

Soma KK, Francis RC, Wingfield JC, Fernald RD. Androgen regulation of hypothalamic neurons containing gonadotropin-releasing hormone in a cichlid fish: integration with social cues. Horm Behav. 1996;30:216-226.

Somoza MG, Stefano A, D'Erano LJ, Canosa FL, Fridman O. Immunoreactive GnRH suggesting a third form of GnRH in addition to cllGnRH and sGnRH in the brain and pituitary gland of *Prochilodus lineatus* (Characiformes). Gen Comp Endocrinol. 1994;94:42-54.

Sower SA, Chiang YC, Lovas S, Conlon M. Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. Endocrinology. 1993;132:1125-1131.

Steven C, Lehnen N, Kight K, Ijiri S, Klenke U, Harris WA, Zohar Y. Molecular characterization of the GnRH system in zebrafish (*Danio rerio*): cloning of chicken GnRH-II, adult brain expression patterns and pituitary content of salmon GnRH and chicken GnRH-II. Gen Comp Endocrinol. 2003;133:27-37.

Swapna I, Sudhakumari CC, Sakai F, Sreenivasulu G, Kobayashi T, Kagawa H, Nagahama Y, Senthilkumaran B. Seabream GnRH Immunoreactivity in brain and pituitary of XX and XY Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* during early development. J Exp Zool. 2008;309(A):2-8.

Torgersen J, Nourizadeh-Lillabadi R, Husebye H, Alestrom P. In silico and in situ characterization of the zebrafish (*Danio rerio*) *gnrh3* (sGnRH) gene. BMC Genomics. 2002;3:25-36.

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

Trudeau VL, Spanswick D, Fraser EJ, Lariviere K, Crump D, Chiu S, MacMillan M, Schulz RW. The role of amino acid neurotransmitters in the regulation of pituitary gonadotropin release in fish. Biochem. Cell Biol. 2000;78:241-259.

Tsutsui K, Ukena K. Hypothalamic LPXRF-amide peptides in vertebrates: identification, localization and hypophysiotropic activity. Peptides. 2006;27:1121-1129.

Tsutsui K, Bentley GE, Ubuka T, Saigoh E, Yin H, Osugi T, Inoue K, Chowdhury VS, Ukena K, Ciccone N, Sharp PJ, Wingfield JC. The general and comparative biology of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). Gen Comp Endocrinol. 2007;153:365-370.

Weber GM, Powell JFF, Park M, Fischer WH, Craig AG, Rivier JE, Nanakorn U, Parhar IS, Ngamvongchon S, Grau EG, Sherwood NM. Evidence that gonadotropin-releasing hormone (GnRH) functions as a prolactin-releasing factor in a teleost fish (tilapia *Oreochromis mossambicus*) and primary structures for three native GnRH molecules. J Endocrinol. 1997;155:121-132.

Weltzien FA, Andersson E, Andersen O, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (*Pleuronectiformes*). Comp Biochem Physiol. A. 2004;137:447-477.

Whitlock KE, Illing N, Brideau NJ, Smith KM, Twomey S. Development of GnRH cells: Setting the stage for puberty. Mol Cell Endocrinol. 2006;254(255):39-50.

White SA, Kasten TL, Bond CT, Adelman JT, Fernald RD. Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormones genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. Neurobiol. 1995; 92:8363-8367.

White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD. Second gene for gonadotropin releasing hormone in humans. Proc Natl Acad Sci. 1998;95:305-309.

White RB, Fernald RD. Genomic structure and expression sites for three gonadotropin releasing hormone genes in on species. Gen Comp Endocrinol. 1998;112:17-25.

White SA, Nguyen T, Fernald RD. Social regulation of gonadotropin-releasing hormone. J Exp Biol. 2002;205:2567-2581.

Whitlock KE, Wolf CD, Boyce ML. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells arise from cranial neural crest and adenohipophyseal regions of the neural plate in the zebrafish, *Danio rerio*. Dev Biol. 2003;257:140-152.

Wirsig CR, Leonard CM. Terminal nerve damage impairs the mating behavior of the male hamster. *Brain Res.* 1987;417:293-303.

Wray S, Grant P, Gainer H. 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* 1989;86:8132-8136.

Wullimann F, Mueller T. Teleostean and Mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior. *J Comp Neurol.* 2004;475:143-162.

Van Putten LJA, Peute J, Van Oordt PGWJ, Goos HJTH, Breton B. Glycoprotein gonadotropin in the plasma and its cellular origin in the adenohipophysis of sham-operated and ovariectomized rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tiss. Res.* 1981;218:439-448.

Ueda H, Young G, Crim LW, Kambegawa A, Nagahama Y. $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one: plasma levels during sexual maturation and in vitro production by the testes of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen Comp Endocrinol.* 1983;51:106-112.

Vickers ED, Laberg F, Adams BA, Hara T, Sherwood MN. Cloning and localization of three forms of gonadotropin-releasing hormone, including the novel whitefish form, in a salmonid, *Coregonus clupeaformis*. *Biol Reprod.* 2004;70:1136-1146.

Von Hofsten J, Olsson PE. Zebrafish sex determination and differentiation: Involvement of FTZ-F1 genes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:63-74.

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

Yamamoto N, Oka Y, Kawashima S. Lesions of gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive terminal nerve cells: effects on the reproductive behavior of male dwarf gouramis. *Neuroendocrinology.* 1997;65:403-412.

Yin H, Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K. A novel G protein-coupled receptor for gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*): identification, expression and binding activity. *J Endocrinol.* 2005;184:257-266.

Yoo MS, Kang HM, Choi HS, Kim JW, Troskie BE, Millar RP, Kwon HB. Molecular cloning, distribution and pharmacological characterization of a novel gonadotropin-releasing hormone ([Trp8] GnRH) in frog brain. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;164:197-204.

Yu KL, Rosenblum PM, Peter RE. In vitro release of gonadotropin releasing hormone from the brain preoptic-anterior hypothalamic region and pituitary of female goldfish. *Gen Comp Endocrinol.* 1991;81:256-267.

Yu WH, Karanth S, Walczewska A, Sower SA, McCann SM. A hypothalamic follicle-stimulating hormone-releasing decapeptide in the rat *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94:9499-9503.

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