

# Obtención de una fracción con actividad gonadotrópica de la hipófisis de la tilapia *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae)

Benjamín Ortíz López,  
Carmen Ramírez Estudillo  
y Rodolfo Cardenas Reygadas

Laboratorio de Histología, Unidad de Morfología y Función. ENEP Iztacala UNAM. Av. de los Barrios s/n, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México.  
C.P. 54090. Fax: (525) 623-1155, E - mail: rodolf@servidor.unam.mx.

Ortíz López, B., C. Ramírez Estudillo y R. Cárdenas Reygadas, 2000. Obtención de una fracción con actividad gonadotrópica de la hipófisis de la tilapia *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae). *Hidrobiológica* 10 (2): 79-84.

## RESUMEN

Se aisló la hormona gonadotrópica a partir de hipófisis de la tilapia, por medio de cromatografía en Sephadex G-100. Se comprobó esto al observarse una banda por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida. Una fracción presentó un patrón de movilidad electroforética similar al de la hormona folículo estimulante de mamíferos y su peso fue calculado en 32 000 Da. Posteriormente se comprobó que la molécula contenida en dicha fracción poseía actividad biológica por medio de un bioensayo con carpas machos y hembras, que presentaron un mayor desarrollo gonadal en comparación con gónadas de peces tratados con hormona luteinizante de mamífero, gonadolac y del grupo control.

**Palabras Clave:** Hormonas gonadotropicas, *Oreochromis*, ovogénesis, espermatogénesis, ovario, testículo.

## ABSTRACT

Gonadotrophic hormone was isolated from pituitary of tilapia through out Sephadex G-100 chromatography and posterior comprobation by electrophoretic polyacrilamide gel.

One fraction had similar electrophoretic mobility to follicle-stimulating hormone, and its molecular weight was calculated as 32 000 Da. Biological activity of the molecule on that fraction was tested through a bioassay with juvenile male and female carps, which gonadal development was more advanced compared with the gonadal development of the fish that were treated with luteinizing hormone of mammals, gonadolac and control group.

**Key words:** Gonadotrophic hormones, *Oreochromis*, oogenesis, spermatogenesis, ovary, testis.

## INTRODUCCIÓN

Las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) de mamífero fueron aisladas tempranamente en la historia de la endocrinología. Sin embargo, las hormonas equivalentes en peces han resultado más difíciles de aislar y caracterizar, y no fue sino hasta 1988 que quedó plenamente demostrada la presencia de dos tipos distintos de gonadotropinas en teleósteos (Suzuki *et al.* 1988a, Kawachi *et al.* 1989, Naito

*et al.* 1991), denominadas respectivamente GtH-I y GtH-II. Entre los métodos de aislamiento y purificación que se han desarrollado para estas hormonas están: cromatografía en columna (Sinha 1969), cromatografía de intercambio iónico (Donaldson y Yamazaki 1968), cromatografía por afinidad (Idler y Ng 1979) y cromatografía líquida de alta resolución (Chang *et al.* 1990), además de combinaciones de estos métodos (Mañanós *et al.* 1997).

El objetivo del presente trabajo fue la obtención de una fracción con actividad gonadotrópica a partir de la hipófisis de tilapia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las hipófisis fueron colectadas en el puerto de Alvarado, Veracruz, México, durante un año. La especie donadora fue la mojarra prieta *Oreochromis niloticus*, debido a que fue la única especie a la que se tuvo acceso gratuito y masivo. Durante la recolección de las glándulas no se tomó en cuenta el sexo, ni el estado de madurez de los organismos, considerando que debido a la selección que de ellos se realizaba por medio de las técnicas de captura, todos los organismos colectados estaban en etapas juvenil o adulta.

Las hipófisis frescas fueron fijadas inmediatamente en acetona a 4°C, y se mantuvieron bajo estas condiciones hasta su procesamiento y durante el mismo.

Las hipófisis fueron pesadas y posteriormente maceradas en acetona por medio de un homogenizador Tekmar mod. SDTV, en una proporción de 1 gramo de tejido húmedo por 3 ml de acetona.

El macerado se lavó con 20 volúmenes de una mezcla acetona-éter y se secó por 24 horas. Una vez seco se registró su peso.

Posteriormente, se agregó etanol al 40% con 6% de acetato de amonio, pH 6.0, en proporción 10 ml de etanol / 1 gramo de tejido. Esta mezcla se mantuvo en agitación por 24 horas. Después la mezcla fue centrifugada a 2500g durante 5 minutos y el sobrenadante recuperado.

A esta solución se le agregaron 3 volúmenes de etanol al 96% por goteo, con agitación constante y se dejó reposar por 24 horas. La solución fue centrifugada a 3000g durante 30 minutos con recuperación de la pastilla, la cual se lavó con tres volúmenes de éter y se centrifugó nuevamente a 2500g durante 30 minutos.

La pastilla fue resuspendida en una solución de acetato de amonio 50mM a pH 5.5 y dialisada contra la misma solución durante 24 horas.

El contenido fue centrifugado nuevamente a 2500g por 30 minutos y se recuperó el sobrenadante, mismo que fue eluido en una columna de Sephadex G-100 de 60 cm y 1 cm de diámetro con 60 ml de acetato de amonio 0.1 M, a pH 8.5 a una velocidad de flujo de 1 ml/ 6 minutos colectandose 30 fracciones de 2 ml cada una (Sinha, 1969).

La cuantificación de proteínas se realizó de acuerdo al método de Lowry (1951), utilizando como patrón albúmina sérica de bovino.

Las fracciones que contenían proteínas fueron sujetas a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% a pH 7.1 y 8 mA en presencia de dodecyl-sulfato de sodio (SDS-page), y reducción con 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se utilizaron como patrones de referencia FSH de porcino (Sigma Chem. F-8001), LH de equino (Sigma Chem. L-2019) y BSA (Sigma Chem A-4378).

El bioensayo se basó en el método reportado por (Sundararaj y Goswami 1965, Sundararaj y Donaldson 1972) con ligeras modificaciones. Se utilizaron 74 carpas juveniles con un peso entre 30-50 g. Se seleccionaron diez organismos al azar para formar el grupo con el objeto de establecer las condiciones iniciales de maduración gonadal. Los ejemplares fueron sacrificados justo al iniciar el experimento, se les disecaron las gónadas, se procesaron con la técnica histológica de rutina y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H-E) (Luna 1968).

Otros ocho peces fueron testigo y no recibieron tratamiento alguno.

Los peces de otro grupo (n = ocho) fueron inyectados con 0.2 ml de acetato de amonio 0.1 M pH 8.5 que se utilizó como vehículo para disolver la hormona aislada, formando el grupo control.

Otros seis grupos de peces con ocho organismos cada lote, fueron sujetos a uno de los siguientes tratamientos: Extracto hipofisiario de mamífero (gonadolac, Laboratorio Gortie S.A.) a dosis de 10, ó 50 mg/kg (grupo gonadolac), LH de mamífero a dosis de 10, ó 50 mg/kg (grupo LH), y la fracción con actividad gonadotrópica obtenida a partir de tilapia (O-GtH) a dosis de 10, ó 50 mg/kg (grupo O-GtH).

Antes de iniciar el experimento los peces fueron sometidos a una semana de aclimatación, durante la cual, así como durante el experimento, las condiciones fueron controladas a una temperatura de 20°C y un fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas de oscuridad. Las carpas fueron alimentadas *ad libitum* con alimento comercial balanceado y mantenidas con aireación constante. Durante 40 días los organismos de los grupos testigo, gonadolac, LH y O-GtH fueron inyectados intraperitonealmente (ip) en 20 ocasiones con intervalos de 48 horas entre cada inyección, por medio de una jeringa insulínica con aguja del # 26, durante los meses de marzo, abril y mayo. En todas las ocasiones las soluciones fueron preparadas justo antes de ser administradas.

Todos los organismos fueron sacrificados un día después de la última inyección. Los organismos fueron pesados, decapitados y las gónadas disecadas, pesadas y se tomaron muestras de las regiones anterior, media y poste-

rior para ser sometidas a procesamiento histológico de rutina con tinción de hematoxilina y eosina (Luna 1968).

Los cortes fueron revisados en un microscopio óptico para identificar los tipos celulares presentes y determinar en base a estos, el grado de desarrollo gonadal.

### RESULTADOS

De 30 g de hipófisis en peso húmedo de *Oreochromis* se obtuvo 1.742 g en peso seco. Después del aislamiento en sephadex se registraron 25.2 mg de proteína.

Tres picos de proteína se detectaron a lo largo de las diferentes fracciones, y fueron denominados alternativamente A, B y C, respectivamente (Fig. 1).

#### PICOS DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

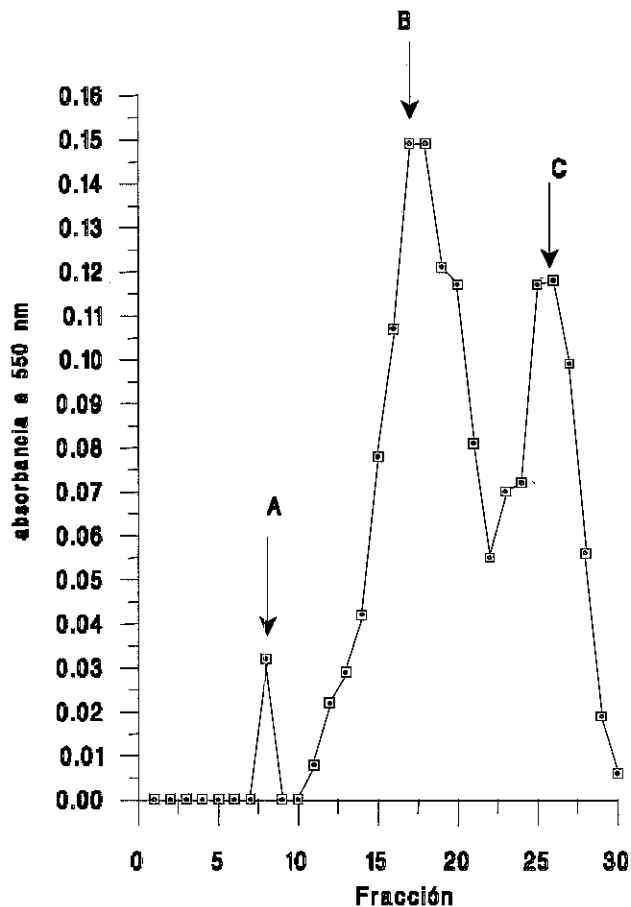


Fig. 1.- Gráfica que muestra la relación de absorbancia con respecto a las fracciones eluidas en Sephadex G-100. Las proteínas del pico B correspondieron a la hormona gonadotrópica. (para mayor detalle ver texto).

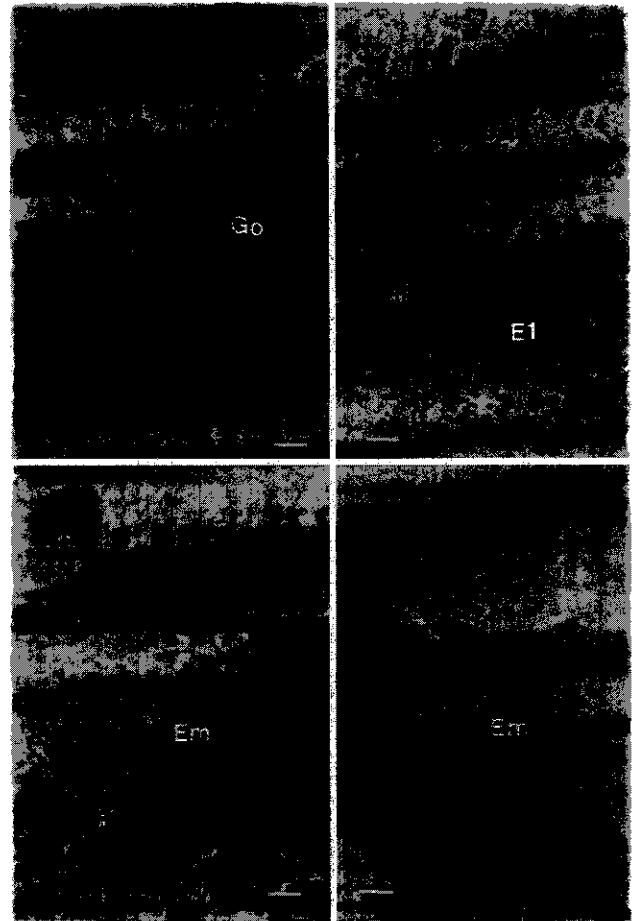


Figura 2. Diferentes tipos celulares de la espermatogénesis registrados en los diferentes tratamientos. a) Grupo testigo; b) Tratamiento con Gonadolac 10 mg; c) Tratamiento con LH 10 mg; d) Tratamiento con 10 mg de O-GtH. Go y GO, Espermatogonias; E1, Espermatocitos primarios; E2, Espermatocitos secundarios; Em, Espermátides; Ti, Tejido intersticial. Tamaño de la barra 20 mm.

El pico B comprendió de las fracciones 17 y 18 y la concentración total de proteínas de estas fracciones fue de 544 µg/ml. Su migración electroforética fue similar a la FSH y la LH y su peso molecular fué calculado en 32 000 Da, por esta razón se decidió utilizar el pico B para el bioensayo.

Los resultados del bioensayo mostraron que el tratamiento más efectivo fue con 50 mg/kg de peso corporal de la proteína incluida en el pico B, puesto que en los cortes tanto de ovario como testículo de los peces sometidos a este tratamiento se observó la presencia de células en etapas más avanzadas de la gametogénesis respecto a los otros tratamientos (Figs. 2, 3, 4, Tabla I).

Los cortes histológicos evidenciaron que en los organismos de ambos sexos pertenecientes a los grupos testigo (Fig. 2a) y control (Figs. 3a, 4a, 4b.) no se

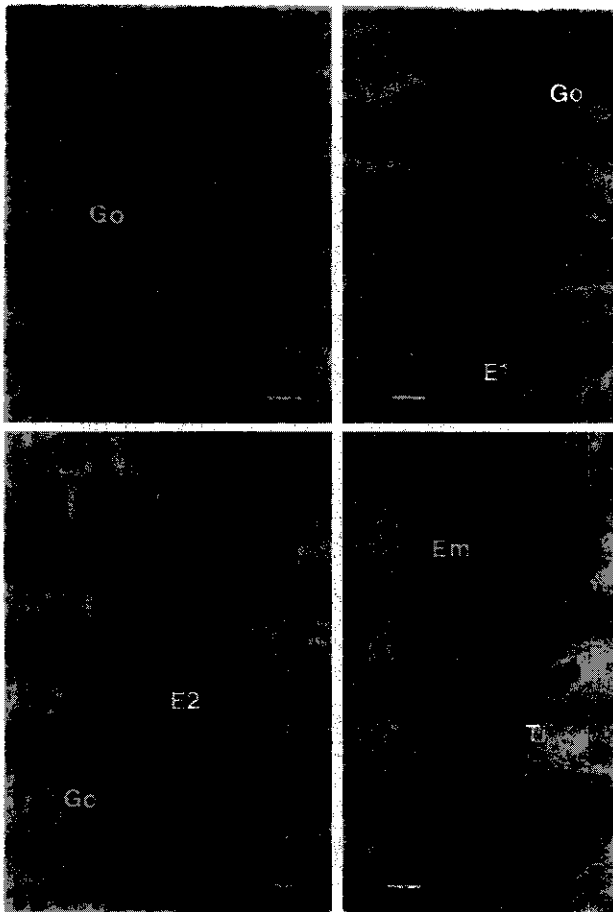


Figura 3. Diferentes tipos celulares de la espermatogénesis registrados en los diferentes tratamientos. a) Grupo control; b) tratamiento con Gonadolac 50 mg; c) Tratamiento con LH 50 mg; d) Tratamiento con 50 mg de O-GtH. Tamaño de la barra 20 mm.

presentaron etapas de maduración gonadal, encontrándose sólo espermatogonias, en el caso de los machos y ovocitos en etapas previtelogénicas en el caso de las hembras.

Un caso similar fue para el grupo de condiciones iniciales de madurez gonádica, aunque en este lote de organismos sólo se contó con la presencia de machos debido a que la selección de los organismos fue realizada al azar como se indicó en la metodología.

Las hembras tratadas con extracto hipofisiario de mamífero para ambas dosis (10, y 50 mg/kg) no presentaron avance en la ovogénesis, pues en los cortes de ovario ovocitos previtelogénicos fueron encontrados (Fig. 4d, Tabala I).

Para los machos que constituían este grupo, un estado de avance en la espermatogénesis fue detectado al presentarse una proporción de espermatozoides primarios a

una concentración de 10 mg/kg (Fig. 2b, Tabala I), proporción que se ve incrementada en los machos que fueron tratados con 50 mg/kg (Fig 3b, Tabala I).

Los peces inyectados con LH de mamífero a dosis de 10 mg/kg, en el caso de los machos mostraron la presencia de espermatogonias, espermatozoides primarios y espermatozoides secundarios (Fig. 2c, Tabala I), mientras que las hembras no manifestaron diferencias con respecto a los grupos descritos anteriores.

Con la inyección de LH de mamífero a dosis de 50 mg/kg, los machos presentaron menos espermatogonias, y una mayor proporción de espermatozoides primarios y secundarios e incluso algunas espermátides (Fig. 3c, Tabala I). Para las hembras sometidas a esta dosis, tampoco se registraron variaciones en el tipo celular, con respecto a los grupos anteriores (Fig. 4c, Tabala I).

Los peces tratados con la fracción que presentó actividad gonadotrópica, registraron mayores fases de maduración de las gónadas. En el caso de machos, no se registraron espermatogonias en los cortes y una mayor abundancia de espermátides se observó, siendo ello más

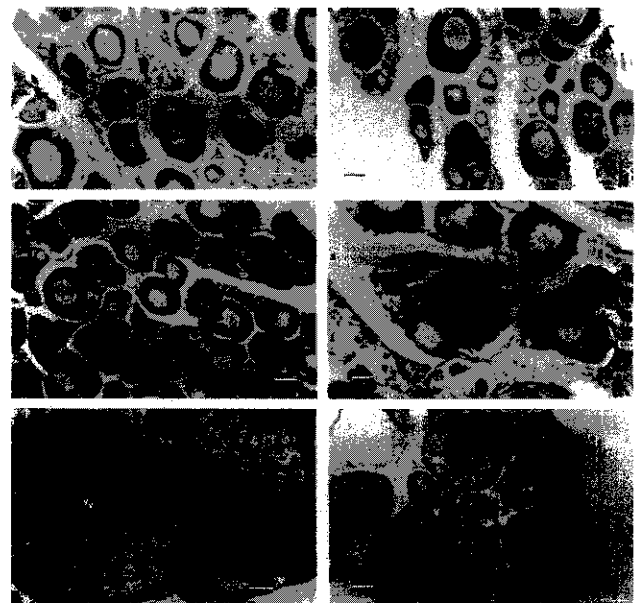


Figura 4. Diferentes tipos celulares de la ovogénesis registrados en los tratamientos. a) Grupo testigo, tamaño de la barra 50 mm; b) Grupo control, tamaño de la barra 50 mm; c) Tratamiento con LH 50 mg, tamaño de la barra 50 mm; d) Tratamiento con 50 mg de O-GtH, tamaño de la barra 50 mm; e) Tratamiento con 10 mg de O-GtH, tamaño de la barra 100 mm; f) Tratamiento con 50 mg de O-GtH, tamaño de la barra 100 mm. Pv, Ovocitos previtelogénicos; Vv, Ovocitos con vesículas vitelinas; V, y flecha, Ovocitos en vitelogenénesis.

Tabla I. Resultados cualitativos de las diferentes etapas de la gametogénesis encontradas tanto en ovario como en testículo de los organismos tratados. Nótese que el tratamiento más efectivo en la inducción a la gametogénesis fue de 50 mg de la gonadotropina aislada, seguida por el tratamiento de 10 mg de la gonadotropina de *Oreochromis*, y en tercer lugar por el tratamiento con LH y posteriormente con gonadolac.

Tratamiento	Dosis	No. de Peces	No. de Inyecciones	Respuesta Gonadal						
				Go	E1	E2	Em	PV	VeVi	Vit
O-GtH	50 mg	8	20	—	—	—	+++	++	+++	+++
O-GtH	10 mg	8	20	—	+	++	+++	++	++	+
Gonadolac	50 mg	8	20	++	+++	—	—	+++	—	—
Gonadolac	10 mg	8	20	+++	++	—	—	+++	—	—
LH	50 mg	8	20	+	+	++	++	+++	—	—
LH	10 mg	8	20	++	++	+	+—	+++	—	—
Control		8	20	+++	—	—	—	+++	—	—
Testigo		8	—	+++	—	—	—	+++	—	—
Condición Inicial		10	—	+++	—	—	—	n/p	n/p	n/p

+++ presencia abundante; ++ presencia regular; + presencia limitada; +— presencia escasa; — ausencia; n/p no se presentaron organismos de este sexo en el grupo.

Go, Espermatogonias; E1, Espermatocitos primarios; E2, Espermatocitos secundarios; Em, Espermatídes; PV, Ovocitos previtelogénicos; VeVi, Ovocitos con vesículas vitelinas; Vit, Ovocitos vitelogénicos.

evidente en los machos inyectados con dosis de 50 mg/kg (Fig. 3d, Tabla I). En las hembras la aparición de ovocitos en etapa de vesículas vitelinas a dosis de 10 mg/kg (Fig. 4e, Tabla I), y de algunos ovocitos en etapas de vitelogénesis para dosis de 50 mg/kg fueron evidentes (Fig. 4f, Tabla I).

## DISCUSIÓN

La cantidad de gonadotropina presente en la fracción activa en este trabajo, a un costo relativamente bajo, fue equiparable a la obtenida por otros autores con procesos de purificación similares (Borzawa-Gerard 1971, Donaldson y Yamazaki 1972).

Otras técnicas con mayores recursos tecnológicos como la cromatografía líquida de alta resolución, permiten obtener mejores rendimientos (Suzuki *et al.* 1988a, Chang *et al.* 1990, Naito *et al.* 1991, Mañanós *et al.* 1997) aunque implican una gran inversión en equipo.

Para el género *Oreochromis* se ha reportado la presencia de un sólo tipo de hormona gonadotrópica correspondiente a la denominada GtH-II o maduracional (Naito *et al.* 1991). En el presente trabajo se aisló sólo un tipo de gonadotropina y su peso molecular es similar al reportado para otras gonadotropinas de teleosteos (Donaldson y Yamazaki 1972, Jollés *et al.* 1977, Idler y Ng 1979, Mañanós

*et al.* 1997), y aunque entre los vertebrados las gonadotropinas de teleosteos y mamíferos son las que menor grado de homología presentan, esta relación continua siendo importante (Kawauchi *et al.* 1989), y el obtener una migración electroforética y por lo tanto un peso molecular similar al de la FSH y la LH, constituyen elementos para considerar que el material aislado corresponde a esta clase de hormona.

El tratamiento más efectivo fue con 50 mg/kg de peso corporal de la hormona de *Oreochromis*, seguido del grupo tratado con 10 mg/kg de peso corporal de la misma hormona, al presentar etapas más avanzadas de la gametogénesis en ambos tipos de gónadas, comparados con los otros grupos. Ambos tratamientos promovieron mayor diferenciación de la gametogénesis tanto en machos como hembras, con un mayor número de espermátides en los cortes de testículo en ambos grupos y ovocitos en etapa de vesículas vitelinas en ambos tratamientos, e incluso inicio de vitelogénesis cuando se aplicó a las hembras en dosis de 50 mg/kg. El segundo mejor tratamiento aunque distante en resultados cualitativos con respecto al de la hormona purificada, fue el de 50 mg/kg de peso corporal de LH, seguido nuevamente, en cuanto a efectividad se refiere, a la aplicación de la misma sustancia en concentraciones de 10 mg/kg de peso corporal, lo cual concuerda con datos reportados por diversos autores (Sundararaj y Anand 1971,

Kawauchi *et. al* 1989), en el sentido de que, de las hormonas de mamífero, la LH resulta más efectiva en la estimulación de la gametogénesis. Sin embargo, la estimulación de la gametogénesis sólo se observó en machos que si presentaron fases más avanzadas de la espermatogénesis con respecto de los grupos de condición inicial, control y testigo.

Esta adaptación metodológica puede constituirse como una valiosa herramienta con aplicación directa a la investigación en las diversas especies de peces tropicales, o con fines de acuicultura.

### LITERATURA CITADA

- BURZAWA-GERARD, E., 1971. Purification d'une hormone gonadotrope hypophysaire de poisson téléostéen, le carpe (*Cyprinus carpio* L.). *Biochimie* 53: 545-552.
- CÁRDENAS L. M., 1998. Purificación de hormona foliculo estimulante de origen equino para inducir el estro en vacas. Tesis de Licenciatura en Biología. ENEP Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 50 p.
- CHANG, Y. S., C. J. HUANG, F. L. HUANG y T. B. LO, 1990. Purification, characterization, and molecular cloning of gonadotropin subunits of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *General Comparative Endocrinology* 78: 23-33.
- DONALDSON, M. E. y F. YAMAZAKI, 1968. The effects of partially purified salmon pituitary gonadotropin on spermatogenesis, vitellogenesis and ovulation in hypophysectomized goldfish, *Carassius auratus*. *General Comparative Endocrinology* 11: 292-299.
- DONALDSON, M. E. y F. YAMAZAKI, 1972. Preparation of gonadotropin from salmon *Oncorhynchus tshawytscha* pituitary glands. *General Comparative Endocrinology* 18: 469-481.
- IDLER, R. D. y T. B. NG, 1979. Studies on two types of gonadotropins from both salmon and carp pituitaries. *General Comparative Endocrinology* 38: 421-440.
- JOLLÉS, J., E. M. BURZAWA y Y. A. FONTAINE, 1977. The evolution of gonadotropins: some molecular data concerning a non-mammalian pituitary gonadotropin, the hormone from a teleost fish *Cyprinus carpio* L. *Biochimie* 59: 893-898.
- KAWAUCHI, H., K. SUZUKI, H. ITOH, P. SWANSON, N. NAITO, Y. NAGAHAMA, M. NOZAKI, Y. NAKAI y S. ITOH, 1989. The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiology Biochemistry* 7: 29-38.
- LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FAR y R. J. RONDALL, 1951. Protein measurement with the phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- LUNA, L. G., 1968. *Manual histologic staining methods of the Armed Forces*. Institute of Pathology. Mc. Graw Hill, Nueva York. 258 p.
- MAÑANÓS, E. L., P. SWANSON, J. STUBBLERFIELD y Y. ZOHAR, 1997. Purification of gonadotropin II from a teleost fish, the hybrid striped bass, and development of a specific enzyme-linked immunosorbent assay. *General Comparative Endocrinology* 108: 209-222.
- NAITO, N., S. HYODO, N. OKUMOTO, A. URANO y Y. NAKAY, 1991. Differential production and regulation of gonadotropins GtH I y GtH II in the pituitary gland of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, during ovarian development. *Cell Tissue Research* 266: 457-467.
- SINHA, V. R. P., 1969. Chromatography of fish pituitary extracts on Sephadex G-100. *Journal Chromatography* 44: 624-628.
- SUNDARARAJ, B. I. y S. V. GOSWAMI, 1965. Seminal vesicle response of intact, castrate and hypophysectomized cat fish, *Heteropneustes fossilis*. (Bloch). To testosterone propionate, prolactin and growth hormone. *General Comparative Endocrinology* 5: 464-474.
- SUNDARARAJ, B. I. y T. C. ANAND, 1971. Effects salmon pituitary gonadotropin, Ovine luteinizing hormone, and testosterone on the testes and seminal vesicles of hypophysectomized Catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *General Comparative Endocrinology* 17: 73-82.
- SUNDARARAJ, B. I. y E. M. DONALDSON, 1972. Effects of partially purified salmon pituitary gonadotropin on ovarian maintenance, ovulation, and vitellogenesis in the hypophysectomized catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *General Comparative Endocrinology* 18: 102-114.
- SUZUKI, K., Y. NAGAHAMA y H. KAWAUCHI, 1988a. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *General Comparative Endocrinology* 71: 292-301.
- SUZUKI, K. y H. KAWAUCHI, 1988b. Isolation and characterization of subunits from two distinct salmon gonadotropins. *General Comparative Endocrinology* 71: 302-306.

Recibido: 4 de abril de 2000.

Aceptado: 14 de septiembre de 2000.