© Universidad Científica del Perú
Ciencia amazónica (Iquitos) 2014; 4(2): 151-159

Artículo Original

Determinación del sexo en arahuana *Osteoglossum bicirrhosum* mediante la detección de los niveles plasmáticos de vitelogenina

[Determination of sex in silver arowana *Osteoglossum bicirrhosum* by detecting plasma levels of vitellogenin]

Pedro Ramírez-Arrarte[1], Jesús Núñez-Rodríguez[2], Fred Chu-Koo[3,4]

[1]Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Escuela de Post Grado, Cátedra CONCYTEC, Maestría en Acuicultura, Iquitos, Perú.
[2]Institut de Recherche pour le Développement-IRD. Calle Teruel N° 357. Miraflores – Lima 18. Perú.
[3]Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana-IIAP. Filial Amazonas. Chachapoyas, Perú.
[4]Universidad Nacional Intercultural de la Amazonía-UNIA. Facultad de Ingeniería y Ciencias Ambientales. Pucallpa, Perú.
[*]e-mail: peramz@hotmail.com

Resumen
El objetivo del trabajo fue desarrollar un protocolo basado en ensayos inmuno-enzimáticos (EIA) para la detección de la vitelogenina (Vtg) plasmática en 48 ejemplares adultos de la especie arahuana (*Osteoglossum bicirrhosum*) y estudiar la factibilidad técnica de su empleo como un método de sexaje en este pez amazónico. El estudio se realizó en el Centro de Investigaciones Quistococha del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. El protocolo de sexaje se compone de nueve pasos que son explicados detalladamente en el presente documento. De los 48 peces adultos analizados, los resultados de la lectura de vitelogenina plasmática revelaron la presencia de 15 hembras y 33 machos. La densidad óptica (DO) de los 48 ejemplares analizados varió entre mínimas de 0,030 a máximas de 0,560, estimándose en 0,100 el valor límite de DO que separa a los machos de las hembras. Los machos presentaron una densidad óptica siempre menor al valor límite (entre 0,030 – 0,053), mientras que en las hembras, los valores de DO variaron entre 0,127-0,560. Este método permite detectar la presencia de vitelogenina plasmática en arahuana, tornándose en un potencialmente efectivo método de determinación del sexo de esta especie.

Palabras clave: plasma, EIA, vitelogenina, sexaje, arahuana

Abstract
The goal of this work was the development of an approach based on immune-enzyme assays (EIA) for the detection of plasma vitellogenin (Vtg) in 48 adults of arahuana (*Osteoglossum bicirrhosum*) and to evaluate the technical feasibility of its use as a method for sexing this Amazonian fish. The study was conducted at the Quistococha Research Center of the Peruvian Amazon Research Institute – IIAP. The sexing protocol consists of nine steps that are explained in detail in this document. Of the 48 adult fish analyzed, the results of plasma vitellogenin readings revealed the presence of 15 females and 33 males. The optical density (OD) of 48 plasma samples ranged from minimum of 0.030 to maximum of 0.560, and we estimated at 0.100 OD value the limit that separates males from females. Males had an optical density always less than the limit (<0.100 OD), while in females, OD values varied between 0.127-0.560. This method allows the detection of plasma vitellogenin in arahuana, turning this technique in an effective method for gender determination in this species.

Keywords: plasma, EIA, vitellogenin, sexing, silver arowana.

Recibido: *09 de Mayo de 2014*
Aceptado para publicación: *19 de Agosto de 2014*

INTRODUCCIÓN

La diversidad de peces amazónicos en el Perú se estima en poco más de 700 especies, de ellas alrededor de 400 son aprovechadas como ornamentales, generando gran expectativa por el elevado valor unitario que pueden alcanzar en el marcado externo (Ortíz e Iannacone, 2008). De éstas especies, la arahuana, posee un raro pero especial atractivo ornamental (Agudelo *et al*., 2007), que ha generado ganancias de alrededor de 6 millones de dólares entre 1999 y 2007 (Alcántara *et al*., 2007), que evidencia una fuerte explotación de esta especie en ambientes naturales, comprometiendo principalmente a los machos que son sacrificados por los pescadores para la obtención de las crías (Argumedo, 2009). Esta práctica tiene el riesgo de afectar negativamente la proporción sexual de las poblaciones de esta especie (Alcántara *et al*., 2007), dificultando la producción sostenida de crías que poseen un mercado enorme para el biocomercio internacional (Argumedo *et al*., 2007; Mancera-Rodríguez y Álvarez-León, 2008; Ortiz e Iannacone, 2008).

En este contexto, el cultivo de esta especie constituye una alternativa más para su producción, de esta vez en ambientes controlados. No obstante, para garantizar la formación de parejas reproductoras y el consiguiente incremento en la producción de crías, es necesaria la determinación del sexo, ya que no existe un dimorfismo sexual marcado en esta especie.

El inicio del periodo reproductivo de los peces está marcado por la producción de células germinales y la síntesis de hormonas reproductivas por parte de las gónadas, en particular esteroides necesarios para las diversas etapas de desarrollo de los ovocitos en las hembras (estrógenos y vitelogénesis) y espermatozoides en los machos (andrógenos y espermatogénesis) (Schulz *et al*., 2010). Normalmente, la vitelogénesis se inicia en el hígado por la activación del eje hipotálamo-hipófisis y gónada, en respuesta de señales ambientales y endógenas (Patiño y Sullivan, 2002). La vitelogenina, proteína específica de las hembras de vertebrados ovíparos, es producida bajo la estimulación del estradiol y es transportada por la sangre en grandes cantidades hacia los ovarios durante el ciclo de maduración, e incorporada en los ovocitos progresivamente en forma de vesículas y gránulos de vitelo (Harvey y Hoar, 1981; Stifani *et al*., 1990).

La presente investigación tiene por objetivo, elaborar un protocolo de detección y cuantificación de vitelogenina en el plasma de arahuanas adultas a fin de establecerlo como un método de sexaje en esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigaciones de Quistococha (CIQ) del Programa de Investigación para el Uso y Conservación del Agua y sus Recursos (AQUAREC) del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP), durante los meses de febrero y marzo de 2011.

Selección de reproductores

Se seleccionó 48 ejemplares adultos de arahuana de dos años de edad, marcados e identificados individualmente con chips electromagnéticos. El peso y longitud total promedio de los ejemplares fue de 1,1 ± 0,37 kg y 55,4 ± 0,78 cm, respectivamente. Los peces fueron alimentados con alimento natural (insectos que cayeron en el estanque iluminado con luz artificial durante las noches y peces de forraje de porte pequeño, sembrados periódicamente en los estanques de manejo) y alimento extrusado con un tenor proteico del 26%, dos veces al día, durante seis días a la semana, a una tasa de alimentación del 3%.

Colecta de sangre

Para la colecta de sangre, cada pez fue capturado y colocado sobre una espuma sintética. Se cubrió los ojos con un paño húmedo. Inmediatamente, se colectó 1 ml de sangre utilizando jeringas heparinizadas mediante una punción en un ángulo de 45° en relación al plano del pez, por debajo de la línea lateral y en dirección ventral de la columna vertebral, donde se encuentra la vena caudal.

La muestra de sangre fue depositada en un tubo Eppendorf de 1,5 ml previamente heparinizado, el cual fue rotulado con el número de chip del pez. Una vez en los tubos, las muestras fueron homogenizadas por inversión y colocadas en un contenedor con hielo, evitando el contacto directo, para impedir su congelamiento.

Colecta y conservación del plasma

La sangre heparinizada fue centrifugada a 5000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, se extrajo el sobrenadante que fue trasladado a otro tubo con el mismo número de identificación y seguidamente almacenado a -20 °C para su posterior análisis.

Estandarización de la prueba

En la búsqueda de la concentración óptima que nos ayude en los posteriores ensayos, se utilizó vitelogenina purificada (antígeno) y el anticuerpo obtenido para el reconocimiento del antígeno.

Protocolo de detección de vitelogenina

Se utilizó el plasma de machos probados (con huevos en incubación en la boca) como control negativo y el plasma de machos inducidos con estradiol, como control positivo. Para ello, se adaptó la metodología utilizada por Núñez *et al*. (1989) y Chu-Koo *et al*. (2009).

*Etapa 1: Fijación del antígeno***.**

Se diluyó el plasma colectado (1:2000), en una solución de tampón carbonato 0.05 M, pH 9.6 y fue distribuida con la ayuda de una micropipeta (Eppendorf® 200 µl) a razón de 100 µl en cada pocito de una placa especial (Nunc Maxisorp©) de 12 x 8 (96 pocitos) y sometida a incubación en refrigeración por 12 horas a 4 °C.

Etapa 2: Primer lavado.

Se descartó la solución de fijación y luego se lavó cada espacio de la placa tres veces con 100 µl de tampón fosfato salino + Tween (PBS-T), con ayuda de una micropipeta de 8 canales.

Etapa 3: Saturación.

Con una micropipeta de 8 canales se adicionó en cada pocito, 100 µl de tampón fosfato salino + Tween + suero normal de cerdo (PBS-T-NPS 10 mN, pH 7,4 – 9‰ NaCl – 0,05% Tween 20 – 4% de suero normal de cerdo). Esta nueva solución fue incubada en una estufa a 37 °C por 30 minutos.

Etapa 4: Segundo lavado.

Se descartó la solución de la saturación y luego se lavó la placa tres veces con una micropipeta de 8 canales, adicionando 100 µl de tampón fosfato salino + Tween (PBS-T) en cada espacio de la placa.

Etapa 5: Dilución e incubación del anticuerpo primario (Anti Vtg1).

Con una micropipeta, se adicionó en cada pocito de la placa, 100 µl de una dilución de (1:2000), del Anticuerpo primario (Anti Vtg1) en una solución de tampón fosfato salino + Tween + suero normal de cerdo (PBS-T-NPS). Esta nueva solución se incubó en una estufa a 37 °C por 120 minutos.

Etapa 6: Tercer lavado.

Se descartó la solución incubada con el Anticuerpo primario (Anti Vtg1) y se lavó la placa tres veces, adicionando 100 µl de tampón fosfato salino + Tween (PBS-T) en cada espacio de la placa.

Etapa 7: Dilución e incubación del anticuerpo secundario (Ac2) (Peroxidasa – Conjugada con la Inmunoglobulina de cabra anti inmunoglobulina de conejo, Sigma A6154).

Con la micropipeta de 8 canales, se adicionó en cada pocito de la placa, 100 µl del Anticuerpo secundario (Ac2) diluido (1:2000) en la solución de tampón fosfato salino + Tween + Suero normal de cerdo (PBS-T-NPS). Esta nueva solución se incubó en la estufa a 37 °C por 60 minutos.

Etapa 8: Cuarto lavado.

Se descartó la solución incubada con el Anticuerpo secundario (Atc2) y luego se lavó la placa tres veces, adicionando 100 µl de tampón fosfato salino + Tween (PBS-T) en cada espacio de la placa.

Etapa 9. Revelación de la Peroxidasa.

La actividad de la peroxidasa fue revelada en oscuridad, adicionando en cada pocito, 100 µl de la solución Orto-fenil Diamina (OPD) (0,05%) en 10 ml de tampón citrato (pH 5) conteniendo 0.05% de H_2O_2, dejándola actuar por espacio de 30 minutos. El color amarillo observado en los pocitos indicó que el individuo analizado presentaba cierta concentración de Vitelogenina. Para la lectura de la placa, se adicionó 50 µl de ácido sulfúrico en cada pocito. La densidad óptica (D.O.) fue medida en un lector (Microplate Reader: Modelo 680 BIORAD), usando una longitud de onda de 490 nm.

RESULTADOS

Con el peso (Kg) y longitud total (cm), se obtuvo el coeficiente de determinación entre ambas variables (R^2 = 0,91). Indicándonos que el 91% de las variaciones del peso de los ejemplares, son explicadas por las variaciones de las longitudes totales (Figura 1).

Estandarización Antígeno/Anticuerpo.

De las diluciones entre antígeno y anticuerpo, se observó que a medida que se intensificaba

la dilución, los valores de densidad óptica disminuían y que recién a partir de la dilución de 1:32000 del antígeno, todas las diluciones del anticuerpo se mantuvieron constantes. La dilución del anticuerpo y antígeno elegidos para el ensayo de determinación de vitelogenina fue de 1:2000 (Figura 2).

La capacidad del anticuerpo de reconocer al antígeno, disminuyó proporcionalmente al incremento de la dilución del plasma (anticuerpo) (Figura 3).

Criterio de Sexaje:

Se consideró como ejemplares machos a aquellos que presentaron una densidad óptica por debajo de 0,100 y ejemplares hembras, a aquellas que sobrepasaban dicho valor.

Sexaje de arahuana

Los resultados revelaron que de 48 ejemplares adultos de arahuana, 15 resultaron hembras (barras verdes) y 33 machos (barras azules). La densidad óptica de las hembras varió entre 0,127 y 0,560, mientras que en los machos esta varió entre 0,04 y 0,053 respectivamente (Figuras 4 y 5).

La media y desviación estándar de las densidades ópticas fue de 0,312 ± 0,11 para las hembras y 0,039 ± 0,01 para los machos. La prueba de *t* de Student demostró diferencias significativas entre las densidades ópticas de ambos sexos ($p<0,05$) (Figura 6).

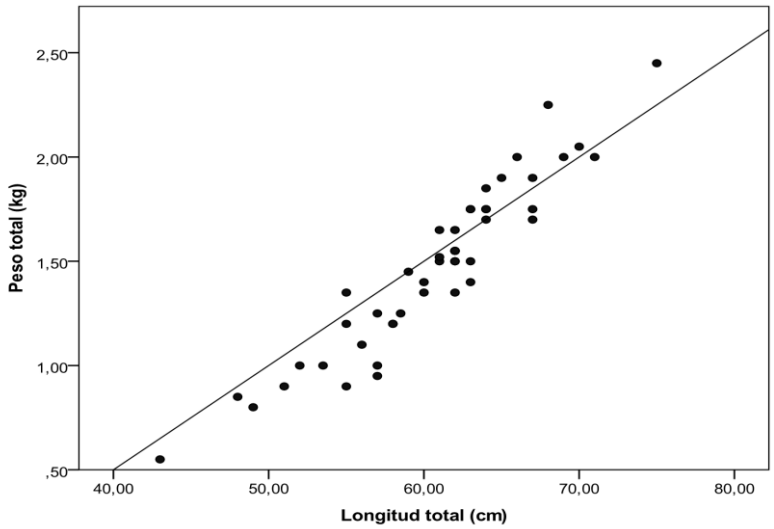

Figura 1. Relación entre las variables longitud y peso de la arahuana *Osteoglossum bicirrhosum* (R^2)

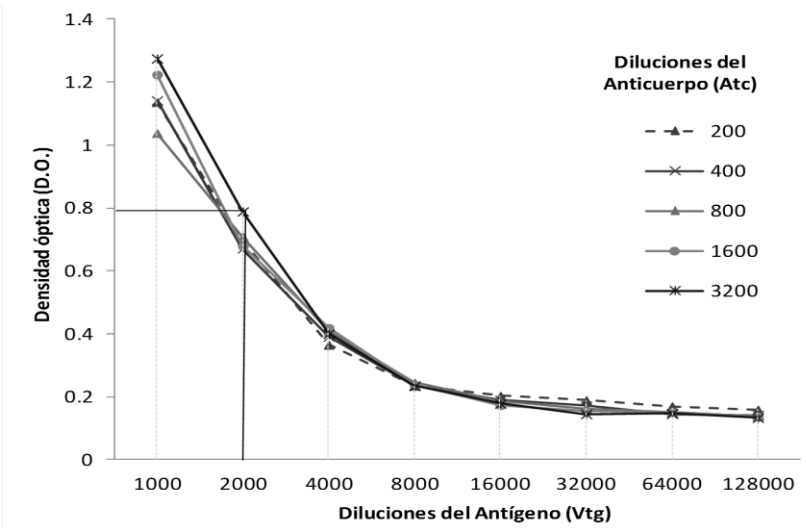

Figura 2. Estandarización de la prueba de dilución óptima de antígeno y anticuerpo para el protocolo de detección y cuantificación de vitelogenina en plasma de *Osteoglossum bicirrhosum*.

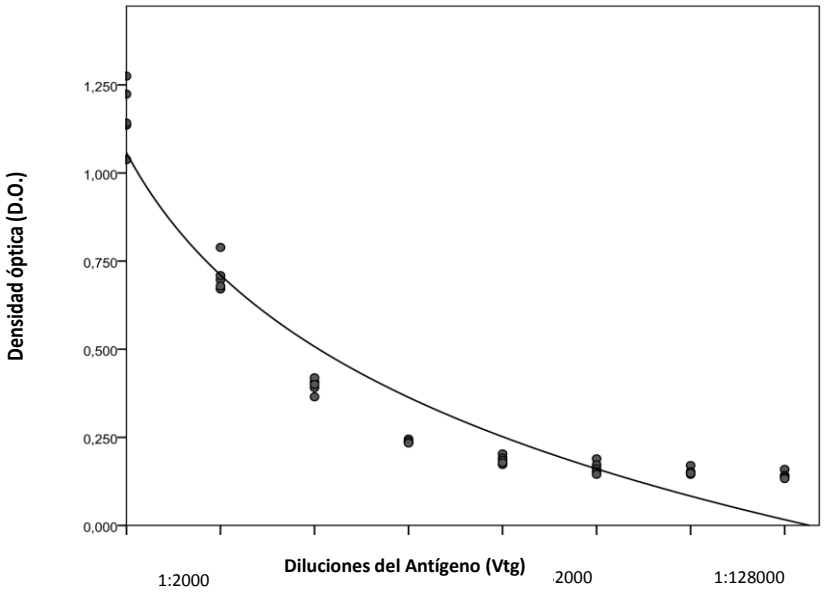

Figura 3. Relación curvilínea inversa entre la dilución del antígeno y la densidad óptica durante las lecturas de vitelogenina en plasma de *Osteoglossum bicirrhosum*.

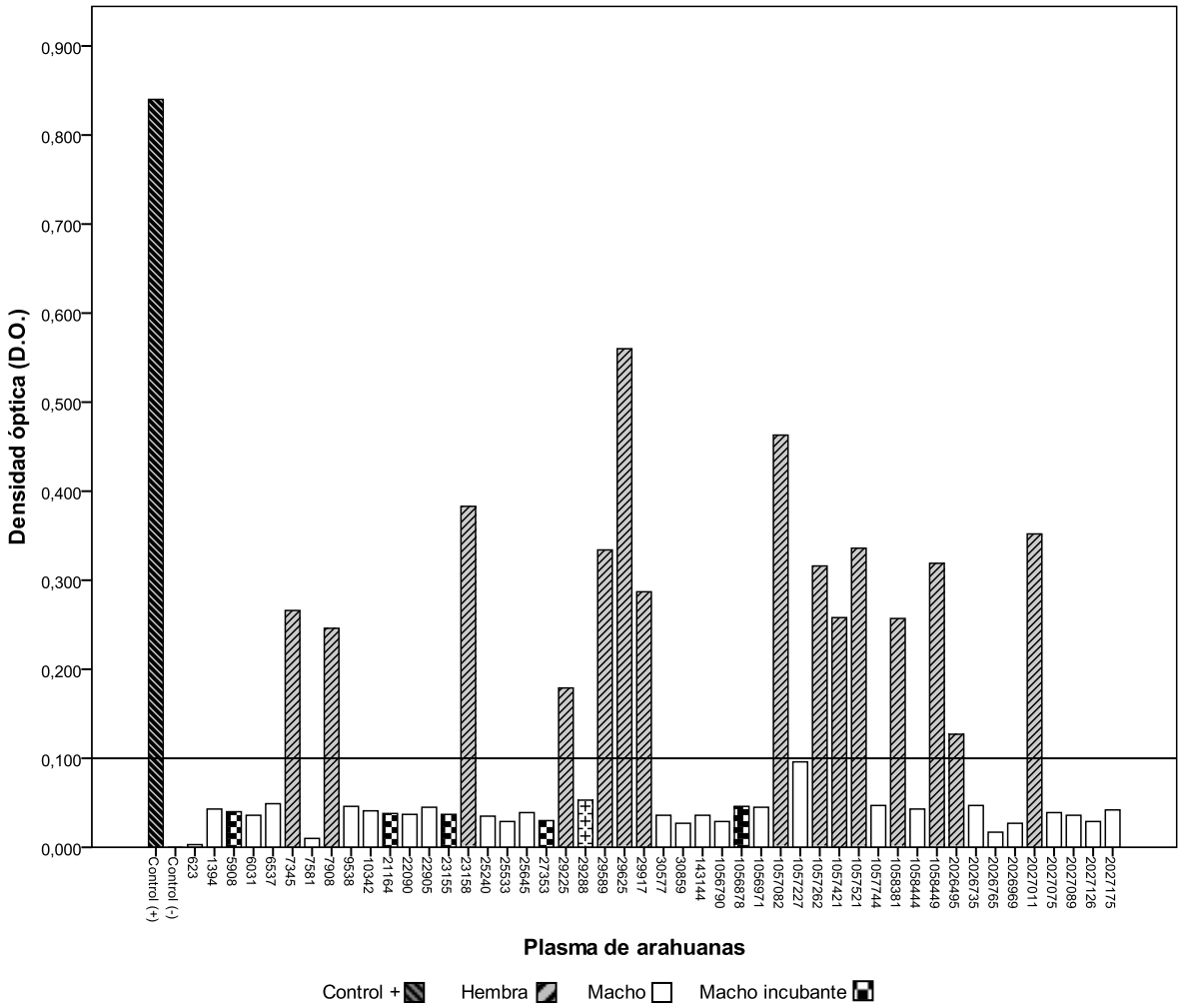

Figura 4. Resultados de los análisis de determinación de vitelogenina en ejemplares de arahuana (*Osteoglossum bicirrhosum*).

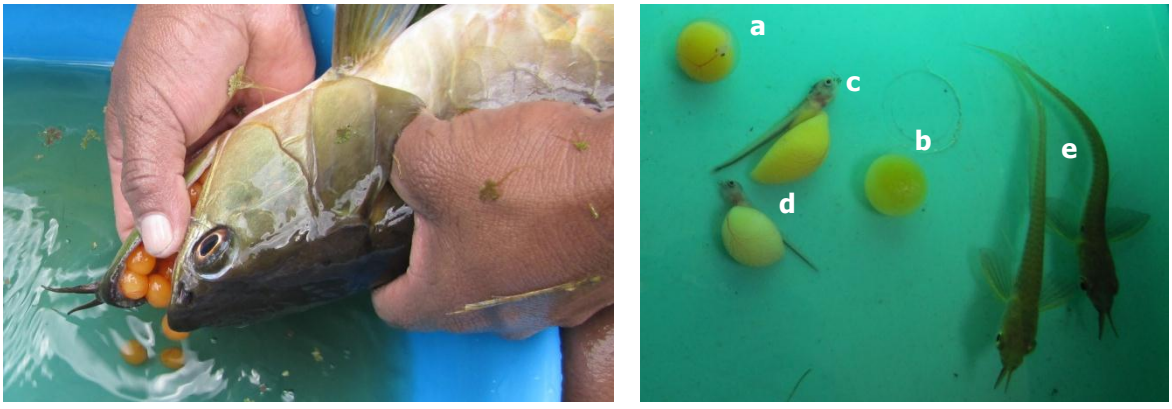

Figura 5. Ejemplar macho incubante y crías: (a,b) huevos; (c,d) larvas y (e) alevinos.

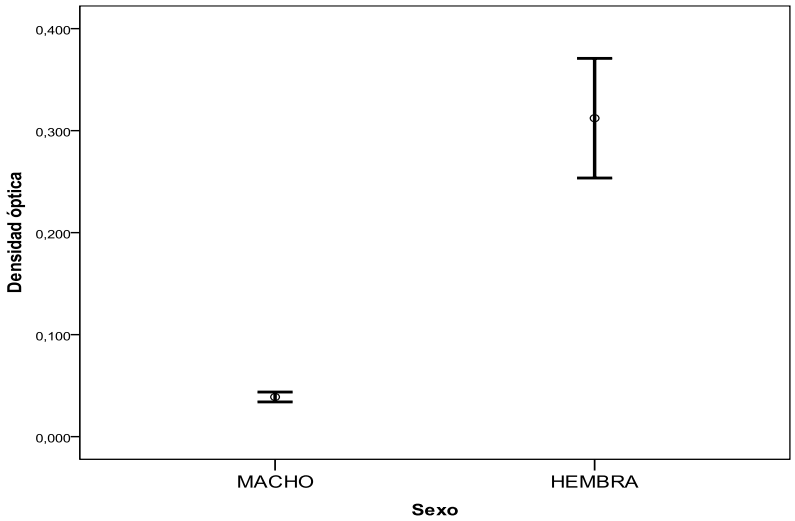

Figura 6. Comparación de medias de las densidades ópticas de los reproductores de arahuana (*Osteoglossum bicirrhosum*).

DISCUSIÓN

La vitelogenina representa una valiosa herramienta en la determinación del sexo en peces adultos (Takemura y Oka, 1998; Ceapa *et al*., 2002; Pottinger *et al*., 2005; Hara *et al.,* 2007 y Heise *et al*., 2009). El presente trabajo es el primer reporte sobre la determinación del sexo en arahuana mediante la detección de vitelogenina y el segundo en lo que respecta a especies amazónicas, luego del estudio pionero de Chu-Koo *et al.* (2009), que incluyó además de la vitelogenina, a esteroides sexuales como la 17β-estradiol y al 11k-testosterona en el paiche, una de las tres especies amazónicas pertenecientes a los Osteoglossiformes.

Según Schulz *et al.* (2010) el inicio del periodo reproductivo de los peces está marcado por la producción de células germinales y la síntesis de hormonas reproductivas por parte de las gónadas. Por su parte, Núñez y Duponchelle (2009) afirman que la presencia de ovocitos en estadio II, indica que la vitelogénesis ha comenzado; de ovocitos en estadio III, que la vitelogénesis finaliza y con ovocitos en estadio IV, marca el inicio del periodo de ovulación. En ese sentido y como esta proteína es específica de las hembras durante el ciclo de maduración ovárica (Stifani *et al*., 1990), el método de detección de la vitelogenina empleada en el presente estudio solo es aplicable en ejemplares en edad reproductiva. Por esta razón, en el presente trabajo se utilizaron ejemplares mayores a 2 años de edad, que son considerados adultos según los criterios de Landines (2007), quien afirma que en cautiverio la madurez gonadal de esta especie es alcanzada en individuos de aproximadamente 2 años, con una longitud cercana a 60 cm y peso cercanos a 1 kg.

Especies como el salmón del Atlántico y el bacalao entran en vitelogénesis diez meses antes del desove, incrementando el tamaño de sus ovocitos por la acumulación de vitelo y completando su maduración una semana antes de la ovulación, todo esto en función de los parámetros ambientales (Taranger *et al.,* 2010). En el caso específico de la arahuana, pueden observarse cambios a través de las modificaciones gonadales (Núñez y Duponchelle, 2009), a principios de noviembre y alcanzando su máximo desarrollo en marzo en la zona de Manaos (Aragão, 1989) y entre los meses de octubre a marzo y con un máximo de intensidad en enero, en el sistema del río Ucayali (Alcántara *et al*., 2007), reforzando los resultados del presente trabajo ya que los plasmas fueron extraídos en el mes de marzo, por lo que se supone que los ejemplares tuvieron una etapa de preparación vitelogénica a través del año anterior.

En este sentido, los cambios en los niveles de vitelogenina plasmática, pueden servir como un biomarcador ideal y no invasivo para detectar el inicio de la maduración gonadal de las hembras (Heise *et al*., 2009), siendo una razón para afirmar que la presencia de concentraciones elevadas de vitelogenina en el plasma de hembras adultas de arahuana indica un grado avanzado de maduración

gonadal. Aunque, es necesario la evaluación temporal de la vitelogenina para comprender aún más la fisiología reproductiva de esta especie y sus variaciones anuales.

Nuestros resultados reportaron la presencia de esta proteína en el plasma de 15 arahuanas, indicando la presencia de uno de los estadios de vitelogénesis mencionados por Núñez y Duponchelle, (2009). Por otro lado, de los 33 plasmas de arahuanas, considerados como machos, 6 ejemplares se encontraron incubando crías en diferentes etapas de desarrollo (huevos, larvas y alevinos). Según Argumedo *et al*. (2007), después de la fecundación, los machos recogen los huevos en la boca y los incuban durante 35 a 40 días. Nuestros resultados confirman que es precisamente el macho de arahuana quien presenta el cuidado parental, situación que favorecería en mejorar su manejo en ambientes naturales y controlados con fines productivos y de conservación ya que para la obtención de las crías generalmente sacrifican a los machos adultos, afectando negativamente la proporción sexual en las poblaciones naturales.

CONCLUSIONES

La presencia y ausencia de vitelogenina en el plasma, puede ser detectada de manera muy sensible por la técnica de ELISA desarrollada. La presencia de vitelogenina únicamente en el plasma de las hembras permite la determinación del sexo de arahuanas adultas mediante este protocolo no invasivo y específico. El sexaje sistemático de los reproductores permitirá establecer nuevos protocolos de cultivo y reproducción para mejorar la producción de alevinos en cautiverio y así aliviar la presión de pesca sobre las poblaciones naturales.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar muestreos mensuales de vitelogenina y así determinar su variación a lo largo de 12 meses y monitorear el ciclo vitelogénico completo de esta especie en cautiverio y de ese modo predecir su período de maduración y reproducción.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana por el apoyo profesional, técnico y logístico. Al CONCYTEC y al Proyecto FDSE-INCAGRO por el financiamiento de los estudios de maestría del primer autor y del presente trabajo de investigación. Al Dr. Fernando Alcántara Bocanegra (IIAP-UNAP), por las sugerencias impartidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcántara F, Chu-Koo F, Chávez C, Tello S, Bances K, Torrejón M, Gómez J, Noriega J. 2007. La pesquería ornamental de la arahuana *Osteoglossum bicirrhosum* (Osteoglossidae) en Loreto, Perú y posibilidades de su cultivo. Folia Amazónica 16 (1-2): 107-114.

Agudelo H, López J, Sánchez C. 2007. Hábitos alimentarios de la arahuana (*Osteoglossum bicirrhosum* Vandelli, 1829) (Pisces: Osteoglossidae) en el alto río Putumayo, área del Parque Nacional Natural La Paya, Putumayo, Colombia. Acta Biológica Par 36 (1-2): 91-101.

Aragão L. 1989. Contribuiçao ao estudo da biología do aruanã, Osteoglossum bicirrhosum, Vandelli 1829, do lado Janauaca – Estado do Amazonas – Brasil. III – Reproduçao e relaçoes biométricas (Osteichthyes – Osteoclossiformes). Ciência Agron Fortaleza 20 (1/2): 59-72.

Argumedo E. 2009. Arahuana Azul. Manual para manejo de reproductores en cautiverio. Asociación de Acuicultores del Caquetá. Servicio Nacional de Aprendizaje. Editorial Produmedios. Colombia. 96 pp.

Argumedo E, López J, Sánchez C. 2007. Sistemas de producción de arawanas suramericanas, una alternativa de aprovechamiento sostenible de la biodiversidad íctica y de fortalecimiento de la acuicultura amazónica. Revista Electrónica de Ingeniería en producción acuícola 2 (2): 99-100.

Ceapa C, Williot P, Le Menn F, Davail-Cuisset B. 2002. Plasma sex steroids and vitellogenin levels in stellate sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas) during spawning migration in the Danube River. J Appl Ichthyol 18: 391-396.

Chu-Koo F, Dugué F, Alván M, Casanova A, Alcántara F, Chávez C, Duponchelle F, Renno J-F, Tello S, Nuñez J. 2009. Gender determination in the Paiche or Pirarucu (*Arapaima gigas*) using plasma vitellogenin, 17b-estradiol, and 11-ketotestosterone levels. Fish Physiol Biochem 35 (1): 125-136.

Hara A, Hirano K, Shimizu M, Fukada H, Fujita T, Ito F, Takada H, Nakamura M, Iguchi T. 2007. Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: Characterization of yolk proteins and development of inmunoassays and use as biomarker of exposure to environmental estrogens. Environmental Sciences 14 (2): 95-108.

Harvey B, Hoar W. 1980. Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Ottawa. Canadá. 48 pp.

Heise R, Bringolf R, Patterson R, Cope G, Ross S. 2009. Plasma vitellogenin and estradiol concentrations in adult Gulf Sturgeon from the Pascagoula River drainage, Mississippi. Transactions of the American Fisheries Society 138: 1028-1035.

Heppell S, Denslow N, Folmar L, Sullivan C. 1995. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. Environmental Health Perspectives 103: 9-15.

Landines M. 2007. Producción de peces ornamentales de la Orinoquía Colombiana. Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola 2 (2): 38.

Mancera-Rodríguez N, Alvarez-León R. 2008. Comercio de peces ornamentales en Colombia. Acta Biol Colomb 13 (1): 23-52.

Nuñez J, Kah O, Geffard M, Le Menn F. 1989. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for sole (*Solea vulgaris*) vitellogenin. Comp. Biochem Physiol 92B: 741-746.

Nuñez J, Duponchelle F. 2009. Towards a universal scale to assess sexual maturation and related life history traits in oviparous teleost fishes. Fish Physiol Biochem 35: 167-180.

Ortiz N, Iannacone J. 2008. Estado actual de los peces ornamentales Amazónicos del Perú que presentan mayor Demanda de exportación. Rev Biologist 6 (1): 54-67.

Patiño R, Sullivan C. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. Fish Physiology and Biochemistry 26: 57-70.

Pottinger T, Pulman K, Carrick T, Scott A. 2005. Evaluation of biochemical methods for the non-destruc-tive identification of sex in upstream migrating salmon and sea trout. J Fish Biol 67: 1514-1533.

Schulz R, Franca L, Lareyre J-J, Legac F, Chiarini-García H, Nobrega R, Miura T. 2010. Spermatogenesis in fish. General and Comparative Endocrinology 165: 390-411.

Stifani S, Nimpf J, Schneider W. 1990. Vitellogenesis in Xenopus laevis and chicken: cognate ligands and oocyte receptors. The binding site for vitellogenin is located on lipovitellin I. J Biol Chem 265 (2): 882-888.

Takemura A, Oka M. 1998. Immunochemical sexing of living yellowfin tuna, *Thunnus albacares* (Bonnaterre), using a vitellogenin-like protein. J Aquaculture Research 29: 245-249.

Taranger GL, Carrillo M, Schulz R, Fontaine P, Zanuy S, Felip A, Weltzien FA, Dufour S, Karlsen O, Norberg B, Andersson E, Hansen T. 2010. Control of puberty in farmed fish. General and Comparative Endocrinology 165: 483-515.