

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIA ANIMAL



**Estudio del control ambiental, hormonal y molecular de la
pubertad anticipada de la lubina aplicando ventanas de
corta duración de luz continua**

TESIS PRESENTADA POR:
Rafael Marcial Rodríguez Pablos

Directores:

Dr. Manuel Carrillo Estévez

Dra. Alicia Felip Edo



Valencia, 2019

AGRADECIMIENTOS

Mi llegada al IATS significó para mí dos cosas: la ilusión de desarrollar mis estudios en lo que tanto me gusta “los peces” en un lugar de reconocimiento académico y de forma estable, y la incertidumbre de iniciarme en un área (fisiología de la reproducción) que hasta ese momento era poco conocida por mí, sobre todo en lo que refiere a las técnicas para su estudio. Sinceramente fue dura mi adaptación, tal vez sufrida, no por voluntad, sino por desconocimiento y por lo concentrado del trabajo. En ocasiones, sobre todo al inicio, me sentía como en un laberinto, donde una persona clave **Alicia Felip Edo** me ayudaba a encontrar la salida poniendo orden y destino. Desde un punto de vista académico si no hubiera sido por tu empeño, tu vigilancia y tu **paciencia**, me hubiera sido más difícil o imposible haber salido de dicho laberinto, es por esto que deseo agradecerte profundamente tu actitud y sobre todo tus ánimos para que esto fuera posible. Por otro lado, la positividad y la disponibilidad de mi director de tesis **Manuel Carrillo Estévez** fueron claves durante todo el doctorado. Gracias Manuel por tus horas al microscopio y gracias porque cada vez que asomaba en tu oficina, siempre me invitabas a entrar y siempre me echabas una mano. Gracias por tu carácter amable y tu empeño de que hiciera las cosas lo mejor posible. Tú y Alicia me ayudaron a tener la esperanza y confianza de que las cosas llegarían a término.

Sería injusto llegado este momento olvidarme del origen de mi doctorado y no agradecer a las personas que, en mayor o menor grado, contribuyeron académicamente a que hoy esté escribiendo estos agradecimientos. Simplemente los mencionaré por orden cronológico: gracias al profesor **Miguel Jover Cerdá**, por haberme otorgado una beca durante mis estudios en la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), sin la cual hubiera sido muy difícil culminar mi fase inicial del doctorado (DEA). Gracias al profesor **Juan Francisco Asturiano Nemesio** (Johnny) de la UPV por sus palabras de recomendación cuando mi director Manuel Carrillo le pidió referencias sobre mí. Gracias Jhonny por tus buenas palabras y porque siempre estuviste dispuesto a ayudarme durante todo este tiempo. Al resto de profesores y compañeros de la UPV: **Ana Tomás Vidal, Silvia Martínez Llorens, Silvia Nogales, Nury, Nacho, Fernando de Benito, José, Jorge, Rodrigo, David y Andrés**, por vuestra amistad y ayuda en una etapa bonita que la recuerdo con mucha nostalgia y agrado...la universidad. A mis compañeros del IATS: **Edmond** quien fue de mucha ayuda en el trabajo de

laboratorio sobre todo durante mi primer año en el instituto, y a todos los demás; **Majo, Berta, Vicky, Gregorio, Sebastián, Olivier y Felipe**, todos, absolutamente todos, en algún momento colaboraron, me dieron algún consejo y sobre todo compartimos momentos gratos. Gracias a Felipe a quien tuve sentado a mi lado buena parte del tiempo que estuve en el IATS y quien fue un compañero entrañable y cómplice de momentos de relax frente al computador, a Majo por avisarme cada vez que dejaba el microscopio encendido o cuando se encontraba un plano de avión en la impresora del edificio ¡Jaa! ;-)...a todos ellos gracias por todos los detalles de buena voluntad que tuvieron hacia mi persona. Y como no mencionar a **Silvia Zanuy, Ana Gómez, y Ana Rocha** quien en ocasiones también colaboraron con todo lo que hacíamos en los muestreos y más. Al personal técnico del IATS; **Sol y Xavi** con su inmensa ayuda en los ELISAS. **Lucinda y Pepe** por toda la labor de histología, a **Amparo**, y por supuesto a **Conrado y Ximo** quienes junto a **Edmond** y mi persona fuimos el **DREAM TEAM** de los muestreos. Infinitos muestreos, eternos en labor y eternos en buen rollo, los cuales se rebautizaban cada viernes en los almuerzos del Tere... gracias a **Conrado y Ximo** por vuestras manos y por ser cómplices de eternas risas y buenas conversaciones. También quisiera mencionar a personas como **Rosa y Charo** a quienes más de una mañana, cuando me dirigía al despacho de becarios, las saludaba y eran capaces de interrumpir su trabajo para regalarme sus saludos y unas amables palabras, gracias por vuestras sonrisas y buena actitud. Pero realmente hay más personas y recuerdos tanto del instituto como de otros centros en los que estuve, que no menciono por intentar ser breve, pero que las llevo en mi memoria y de quienes agradezco su apoyo y amistad en todo este tiempo.

Por último, deseo agradecer a quienes de forma no académica han contribuido, sobre todo en momentos difíciles, a mi permanencia y perseverancia en mis estudios, a mi familia; mi madre, mi hermano Servando, mi hermana Marisol y mis sobrinas, gracias por vuestros incansables consejos y ánimos. A Ana Catalán Cots y su familia por su cariño y ayuda, a Estela Redón Calvillo y a su madre por su ayuda incondicional, por su compañía, por su paciencia y por todo el cariño ofrecido durante todo este tiempo.

Por lo tanto, deseo dedicar esta tesis a todas las personas que participaron en ella tanto académicamente como sentimentalmente...y en especial a mi madre y a mi padre.

RESUMEN

La lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) es una de las principales especies marinas de la acuicultura europea. En España, después de la dorada (*Sparus aurata* L.), es el segundo pez marino más cultivado. Sin embargo, a pesar de que su engorde se viene realizando desde hace décadas, en la actualidad existen todavía problemas reproductivos asociados a su producción. Durante el primer año de vida de esta especie, un alto porcentaje de los machos de lubina maduran prematuramente, lo que trae consigo una disminución de su crecimiento somático durante su segundo año de vida antes de su comercialización. Esta circunstancia implica que los machos precoces tienen que ser mantenidos por mucho más tiempo en las instalaciones acuícolas hasta que alcanzan su talla comercial, lo que supone una mayor inversión en alimentación y, en consecuencia, una disminución de la rentabilidad de las empresas acuícolas. Una forma de mitigar la pubertad prematura de la lubina es mediante la aplicación de regímenes de luz continua (LL). Hay constancia que la aplicación de LL durante 12 meses es efectiva para reducir la precocidad en machos juveniles de lubina durante su primer año de vida. Asimismo existen también estudios que han permitido acotar el tiempo, entre cuatro y seis meses de duración, durante el cual la aplicación de luz continua ha sido efectiva para reducir el porcentaje de precocidad en machos prepúberes, y que han sugerido la existencia de un periodo fotosensible que en el caso de la lubina está comprendido entre Agosto y Octubre. No obstante, este tipo de estrategia no siempre resulta de fácil implementación en los lugares de cría y, además, puede provocar una condición de estrés permanente en los peces en aquellos casos en los que la aplicación de dichos tratamientos es prolongada lo que puede hacerles más vulnerables a enfermedades. Por lo tanto, se hace necesario encontrar periodos fotosensibles en los cuales se puedan aplicar terapias de luz continua de duración más corta e igual de efectivas para reducir la maduración sexual de los peces bajo condiciones de cultivo y que tengan un menor impacto en el bienestar de los animales. Por otro lado, desde un punto de vista endocrino y fisiológico, se necesita también profundizar en el conocimiento sobre cuál es el efecto de la luz continua sobre el eje endocrino que regula el proceso de maduración sexual en esta especie. Esto permitiría tener información básica sobre el control del proceso y de esta forma poder considerar nuevas estrategias enfocadas al manejo reproductivo de peces. Por todo ello, en la presente tesis se evaluaron distintos intervalos de tiempo, desde agosto a

noviembre, a lo largo del primer año de vida de la lubina en los que los animales se sometieron a LL con la finalidad de identificar un periodo fotosensible de corta duración (i.e. 1 mes) que fuera efectivo para reducir la precocidad de los machos de esta especie. Los resultados obtenidos han permitido localizar dicho periodo en el mes de septiembre, un periodo crítico para el inicio de la espermatogénesis en esta especie (**capítulo 4, artículo 1**). De acuerdo con estos resultados, se diseñó una estrategia experimental en la que teniendo en cuenta este periodo fotolábil, se evaluó el efecto que la luz continua tiene sobre las principales hormonas reproductivas y la expresión génica de ciertos factores que a nivel del eje endocrino cerebro-hipófisis-gónada son claves en el proceso espermatogénico de la lubina (**capítulo 5, artículo 2**). Nuestros resultados demuestran que la luz continua puede alterar el contenido de la GnRH-1 y GnRH-2 a nivel cerebral, así como el patrón y los niveles de expresión del gen *fsh β* en la hipófisis. Asimismo, se observó un descenso de los niveles plasmáticos de 11-ketotestosterona, estradiol, testosterona y de la hormona estimuladora del folículo (Fsh), además de la expresión génica de los receptores de estrógenos (*er*), de la hormona anti-mülleriana (*amh*) y de la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (*stAR*) en las gónadas. De acuerdo con los resultados obtenidos, hemos propuesto un mecanismo de control del proceso espermatogénico en la lubina. En este sentido, sugerimos que el estradiol podría potencialmente ser responsable de la renovación de las espermatogonias, mientras que por otro lado la Amh inhibiría su proliferación. Asimismo, nuestros resultados sugieren que la 11-ketotestosterona puede ejercer un efecto inhibitorio sobre la expresión de la *amh* en etapas tempranas de la espermatogénesis de esta especie. Esta hipótesis podría explicar el hecho que los animales sometidos a LL no desarrollen sus gónadas y por tanto no alcancen la maduración temprana. Los animales bajo LL mantienen niveles de expresión de *fsh β* y niveles plasmáticos bajos de esta hormona, lo que implica una reducción de la síntesis de esteroides a nivel gonadal y por tanto niveles bajos de 11-ketotestosterona y estradiol circulantes. Esta situación desemboca con una baja proliferación de las espermatogonias, un hecho que queda constatado con lo observado en nuestros estudios. Esto es, un número reducido de mitosis a nivel testicular que va asociado con una expresión alta de *amh* que ejerce un efecto inhibitorio sobre el progreso de la espermatogénesis, al menos, en la lubina. Por otro lado, si bien los regímenes de luz continua son eficaces para mitigar la pubertad prematura en esta especie, el impacto que éstos tienen durante el segundo año de vida de los animales no está documentado. Por este motivo, en este trabajo se analizó también el efecto que tiene la aplicación de la luz continua

a lo largo del primer y segundo año de vida de los animales (**capítulo 6, artículo 3**). Los resultados de este último experimento demostraron que si bien la luz continua aplicada durante el primer año de vida puede reducir significativamente la maduración precoz de la lubina, durante el segundo año de vida los animales retrasan su maduración gonadal pero son capaces de alcanzar su capacidad reproductiva. Los efectos a nivel del crecimiento también se han analizado en esta tesis, pero las variaciones observadas con otros estudios realizados previamente, requieren nuevos enfoques experimentales para dilucidar las causas de estas discrepancias. Aunque todavía quedan muchas preguntas por contestar, los resultados de esta tesis son un paso más para poder conseguir nuevas herramientas que nos permitan controlar de manera efectiva la producción de lubina en las instalaciones de engorde.

ABREVIATURAS

Amh: hormona anti-mülleriana

ATP: adenosina trifosfato

Cap: cuerpos apoptóticos

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

cfGnRH: Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) de pez gato

cGnRH / cGnRH-II / GnRH-2: GnRH de pollo

CHG / BPG: eje cerebro-hipófisis-gónada ("brain-pituitary-gonad")

CKK: Colecistoquinina

C18: esteroides con 18 átomos de carbono

C19: esteroides con 19 átomos de carbono

C21: esteroides con 21 átomos de carbono

cAMP: monofosfato de adenosina cíclico (adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate)

DDE: días después de la eclosión

DHP: 17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-ona

DNA: ácido desoxirribonucleico

E1: estrona

E₂: estradiol

EGF: factor de crecimiento epidérmico ("epidermal growth factor")

EIA: ensayo inmuno-enzimático

Ein: espermatogonias o células germinales indiferenciadas

Esr: receptores nucleares de estrógenos

Esr1: receptor nuclear de estrógenos subtipo 1

Esr2a / Er β 2: receptor nuclear de estrógeno subtipo 2 o β 2

Esr2b / Er β 1: receptor nuclear de estrógeno subtipo 3 o β 1

eSRS34: sustancia homóloga al factor de crecimiento endotelial celular de humanos ("PD-ECGF")

F: fibrocitos

FSH/Fsh: hormona estimuladora del folículo

Fshr: receptor de la hormona estimuladora del folículo

GABA: ácido γ amino butírico

GH: hormona del crecimiento

GnRH: factor liberador de las gonadotrofinas

GnRHa: análogo de la GnRH

GPCR: receptor acoplado a proteínas G (“G-protein coupled receptor”)

Gper: receptores de membrana

Gpera: receptores de membrana a

Gperb: receptores de membrana b

GPR54: receptor de kisspeptina

GTH(s): gonadotrofina(s)

GTHI: hormona estimuladora del folículo

GTHII: hormona luteinizante

Gnih(s): hormona inhibidora de la gonadotrofina(s)

hCG: gonadotrofina coriónica humana

hrGnRH: GnRH de arenque del pacífico (*Clupea harengus pallasii*)

IGFs: factores de crecimiento similares a la insulina

Igf1: factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1

Igf3 / Igf1b: factor de crecimiento similar a la insulina tipo 3

LH/Lh: hormona luteinizante

Lhr: receptor de la hormona luteinizante

LL: régimen de luz continua durante 24 horas

mdGnRH: GnRH de medaka (*Oryzias latipes*)

mPgr: receptor de membrana de progestina

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

Mt1: receptor 1 de melatonina

Mt2: receptor 2 de melatonina

Mel1c: receptor 1c de melatonina

NA: noradrenalina

NP: régimen de fotoperiodo natural

NPY: neuropéptido Y

pjGnRH: GnRH de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*)

P450arom: enzima aromatasa

P450c17: enzima 17α-hidroxilasa/17,20-liasa

P450scc: enzima citocromo P450 de escisión de la cadena lateral de colesterol

P45011β: P450 11β-hidroxilasa

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (“polymerase chain reaction”)

PD-ECGF: factor de crecimiento endotelial celular de humanos

Pgr: receptor nuclear de progesterona

qRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real

RNA: ácido ribonucleico

rRNA: ácido ribonucleico ribosomal

RT: transcripción inversa

SEM: error estándar de la media

S: células de Sertoli

sbGnRH / sbGnRH-I / GnRH-1: GnRH de dorada (*Sparus aurata*)

sGnRH / sGnRH-III / GnRH-3: GnRH de salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*)

SpA / SPGA: espermatogonias tipo A

SpB: espermatogonias tipo B

SpB1: espermatogonias tipo B1

SpB2: espermatogonias tipo B2

SpB3: espermatogonias tipo B3

SpB4: espermatogonias tipo B4

SpB5: espermatogonias tipo B5

SpB6: espermatogonias tipo B6

SpB7: espermatogonias tipo B7

Spd: espermatidas

Spd I/Spt I: espermatidas primarias

Spd II/Spt II: espermatidas secundarias

Spd III/Spt III: espermatidas terciarias

Spz: espermatozoides

Sp1: espermatocitos primario

Sp2: espermatocitos secundarios

stAR: proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis ("steroidogenic acute regulatory protein")

T: testosterona

Tc: tejido conectivo

TGD: desarrollo gonadal tentativo

Tgfs: factores intragonadales de crecimiento

Tgfβ: factor de crecimiento transformante-β ("transforming growth factor beta")

TSH: tirotrófina

T1: Trial 1

T2: Trial 2

T3: Trial 3

wfGnRH: GnRH de corégono (*Coregonus clupeaformis*)

2n: condición diploide

3R: duplicación del genoma de peces

3 β -HSD: 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ 5- Δ 4-isomerasa

11-KT: 11-cetotestosterona ("11-ketotestosterone")

11 β -HSD: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

17,20 β P / DHP: 17 α ,20 β -hidroxi-4pregnen-3-ona

18srRNA: ácido ribonucleico ribosomal 18s

20 β -HSD: 20 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

20 β -S: 17 α , 20 β trihidroxi-4-pregnen-3-ona

ABREVIATURAS DE GENES

fshr: receptor de la Fsh

gnrh1r: receptor de GnRH 1

gnrh2r: receptor de GnRH 2

gpr54: receptor de kisspeptina

gpr54-1b / kissr2: receptor 1b de kisspeptina

gpr54-2b / kissr3: receptor 2b de kisspeptina

gsdf: factor de crecimiento gonadal derivado del soma ("gonadal soma derived factor")

igf3 / igf1b: factor de crecimiento similar a la insulina tipo 3

lhr: receptor de la Lh

kiss1: kisspeptina tipo 1

kiss2: kisspeptina tipo 2

pgr: receptor nuclear de progestina

pgr1: receptor nuclear de progestina tipo 1

pgr2: receptor nuclear de progestina tipo 2

p-450arom: enzima P450

star: proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis ("steroidogenic acute regulatory protein")

11 β -hsd: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

18srRNA: ácido ribonucleico ribosomal 18s

ABREVIATURAS DE REGÍMENES FOTOPERIÓDICOS

G1LL / LLy: luz continua durante todo un año

G2AS: luz continua desde el 1 de agosto hasta el 30 de septiembre

G3AA: luz continua desde el 1 de agosto hasta el 31 de agosto

G3SO: luz continua desde el 1 de septiembre hasta el 31 de octubre

G4ON: luz continua desde el 1 de octubre hasta el 30 de noviembre

G415AS / LLa/s: luz continua desde el 15 de agosto hasta el 15 de septiembre

G5SS: luz continua desde el 1 de septiembre hasta el 30 de septiembre

LL: luz continua

LLAO: luz continua durante 2,5 meses desde agosto hasta octubre durante el segundo año de vida

LLJO: luz continua durante 4 meses desde junio hasta octubre durante el primer año de vida

LLJO-AO: luz continua desde el 1 de junio hasta el 1 de octubre durante el primer año de vida, luego en el segundo año luz continua desde el 15 de agosto hasta el 31 de octubre

LP: Fotoperiodo constante largo (15 h de luz y 19 h de oscuridad; 15L/9D)

SNP / NP: fotoperiodo natural simulado

NP-NP: fotoperiodo natural simulado durante el primer y segundo año de vida

NP-LP: fotoperiodo natural simulado durante el primer año y luego en el segundo año fotoperiodo constante largo (15L/9D)

LL-NP: luz continua durante el primer ciclo año y luego en el segundo fotoperiodo natural simulado

LL-LP: luz continua durante el primer año y luego en el segundo fotoperiodo constante largo (15L/9D)

MEDIDAS E ÍNDICES

BW: peso corporal ("body weight")

GL: tasa instantánea de crecimiento en talla

GSI: índice gonosomático ("gonadosomatic index")

GW: peso de la gónada ("gonad weight") /tasa instantánea de crecimiento en peso

FC: factor de condición ("condition factor")

FL: talla o longitud furcal ("fork length")

LISTADO DE ESPECIES

Abadejo (*Melanogrammus aeglefinus*)

anguila japonesa (*Anguilla japonica*)

arenque del pacífico (*Clupea harengus pallasii*)

bacalao del atlántico (*Gadus morhua*)

cachama negra (*Colossoma macropomum*)

carpa común (*Cyprinus carpio*)

carpín dorado o goldfish (*Carassius auratus*)

ciprínido (*Pimephales promela*)
congrío japonés (*Conger myriaster*)
corégono (*Coregonus clupeaformis*)
corvina (*Micropogonias undulatus*)
corvina amarilla (*Larimichthys crocea*)
dorada (*Sparus aurata*)
dorada japonesa (*Pagrus major*)
estornino (*Scomber japonicus*)
esturión ruso (*Acipencer gueldenstaedtii*)
fletán o halibut (*Hippoglossus hipoglossus*)
gobio común japonés (*Acanthogobius flavimanus*)
hucho japonés (*Hucho perryi*)
lenguado (*Solea senegalensis*)
lenguado japonés o falso halibut del japon (*Paralichthys olivaceus*)
lubina americana (*Morone saxatilis*)
lubina europea (*Dicentrarchus labrax*)
lucioperca (*Sander lucioperca*)
lumpo (*Cyclopterus lumpus*)
medaka (*Oryzias latipes*)
pejerrey (*Odontesthes bonariensis*)
perca (*Perca flavescens*)
perca euroasiática (*Sander lucioperca*)
pez cebra (*Danio rerio*)
pez gato africano (*Clarias gariepinus*)
pez gato americano (*Ictalurus punctatus*)
pez manibula de cuchillo (*Oplegnathus fasciatus*)
pirrhulina o voladorita (*Pyrrhulina brevis*)
rodaballo (*Scophthalmus maximus*)
salmón amago (*Oncorhynchus rhodurus*)
salmón Chinook o real (*Oncorhynchus tshawytscha*)
salmón coho o plateado (*Oncorhynchus kisutch*)
salmón común o del Atlántico (*Salmo salar*)
salmón hucho (*Hucho perryi*)
salmón japonés (*Oncorhynchus masou*)
salmón keta (*Oncorhynchus keta*)
salmón amago (*Oncorhynchus masou ishikawae*)
seriola aleta amarilla (*Seriola quinqueradiata*)

tenca (*Tinca tinca*)

tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*)

tímalo (*Thymallus thymallus*)

trucha alpina (*Salvelinus alpinus*)

trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

trucha común (*Salmo trutta*)

trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*)

turbot (*Psetta máxima*)

zoárcido (*Zoarces viviparus*)

CONTENIDO

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 BIOLOGÍA DE LA LUBINA.....	10
1.1.1 Aspectos reproductivos de la lubina	11
1.1.2 Estructura y función del testículo.....	12
1.1.3 Pubertad y espermatogénesis en la lubina	14
1.2 LA REPRODUCCIÓN EN PECES: EJE CEREBRO-HIPÓFISIS-GÓNADA .	20
1.2.1 Hormona liberadora de las gonadotrofinas (GnRH).....	21
1.2.2 Gonadotrofinas.....	22
1.2.3 Esteroides sexuales	25
1.2.3.1 Progestinas.....	26
1.2.3.2 Andrógenos	27
1.2.3.3 Estrógenos.....	28
1.2.4 Kisspeptinas.....	29
1.2.5 Melatonina.....	30
1.2.6 Aminoácidos y otras hormonas de importancia en el proceso reproductivo en peces	31
1.3 CONTROL ENDOCRINO DE LA ESPERMATOGÉNESIS EN PECES.....	34
1.4 MADURACIÓN PRECOZ O PUBERTAD PREMATURA.....	41
1.4.1 Pubertad prematura de la lubina	45
1.5 CONTROL FOTOPERIÓDICO DE LA PUBERTAD PREMATURA DE LA LUBINA	46

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

OBJETIVOS	53
-----------------	----

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 REGÍMENES FOTOPERIÓDICOS Y ANIMALES	57
3.2 ANÁLISIS BIOMÉTRICO, MORFOLÓGICO Y PRECOCIDAD	58
3.3 HISTOLOGÍA GONADAL.....	60
3.4 ANÁLISIS HORMONAL	60
3.5 EXPRESIÓN DE GENES.....	61
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	64

CAPÍTULO 4. ARTÍCULO 1

IDENTIFICATION OF A PHOTOLABILE PERIOD FOR REDUCING SEXUAL MATURATION IN JUVENILE MALE SEA BASS (<i>Dicentrarchus labrax</i>) BY MEANS OF A CONTINUOUS LIGHT REGIME.....	67
Introduction	67
Materials and methods	70
Animals and photoperiodic regimes	70
Morphological and precocity analysis.....	70
Hormonal analysis	71
Testis histology.....	71
Statistical analysis	71
Results.....	72
Trial 1	75
Trial 2	77
Discussion.....	79
Acknowledgments.....	82
References.....	82

CAPÍTULO 5. ARTÍCULO 2

ADVANCED PUBERTY TRIGGERED BY BI-WEEKLY CHANGES IN REPRODUCTIVE FACTORS DURING THE PHOTOLABILE PERIOD IN A MALE TELEOST FISH, <i>Dicentrarchus labrax</i> L.....	89
Introduction	89
Materials and methods	91
Animals and photoperiodic regimes	91
Growth, gonadal maturation and sample collection.....	92
Hormonal analyses	93
Relative expression of <i>fshβ</i> in the pituitary and <i>amh</i> , <i>star</i> , <i>erβ1</i> and <i>erβ2</i> in the gonad by quantitative real-time PCR.....	93
Statistical analysis.....	94
Results	96
Growth and male maturation	96
Seasonal changes in the content of three forms of GnRH in the brain and <i>fshβ</i> expression levels in the pituitary	100

Seasonal changes in <i>amh</i> , <i>star</i> , <i>erβ1</i> and <i>erβ2</i> expression levels in the gonad and evolution of spermatogonial mitoses in males	102
Seasonal changes in hormonal plasma levels	105
Discussion.....	107
Acknowledgements	111
References.....	112

CAPÍTULO 6. ARTÍCULO 3

EFFECT OF COMBINING DIFFERENT PHOTOPERIOD REGIMES ON THE SEXUAL MATURATION OF MALE SEA BASS (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.) DURING THE FIRST TWO YEARS OF LIFE.....	125
Introduction	125
Materials and methods	127
Fish and experimental conditions.....	127
Sampling protocol	129
Statistical analysis	130
Results	130
Growth.....	130
Gonadomatic Index.....	135
Spermiation rate	136
Duration of spermiation in males.....	139
Discussion.....	140
Acknowledgement.....	144
References.....	145

CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN.....	151
----------------	-----

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES	159
--------------------	-----

CAPÍTULO 9. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA	163
--------------------	-----

LISTADO DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

- Figura 1.1.** Lubina europea (*Dicentrarchus labrax*)..... 10
- Figura 1.2.** Distribución geográfica de la lubina (*Dicentrarchus labrax*) 11
- Figura 1.3.** Estructura de un testículo tipo lobular en un pez teleósteo 13
- Figura 1.4.** Esquema representativo de la espermatogénesis en peces 16
- Figura 1.5.** Microfotografías de testículos de lubina (*Dicentrarchus labrax*) .. 18
- Figura 1.6.** Ruta de biosíntesis de los esteroides gonadales en peces teleósteos.....26
- Figura 1.7.** Resumen de las principales rutas y factores endocrinos que afectan el proceso espermatogénico en peces.....41
- Figura 1.8.** Regímenes de luz continua (LL) aplicados durante el primer año de vida en machos de lubina y que reducen significativamente la maduración precoz48

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

- Figura 3.1.** Medición de la longitud del pez mediante tabla graduada..... 59
- Figura 3.2.** Pez abierto en canal..... **¡Error! Marcador no definido.**
- Figura 3.3.** Placa utilizada para el análisis mediante ELISA de las distintas hormonas estudiadas.....61

CAPÍTULO 4. ARTÍCULO 1

- Figura 4.1.** Photoperiod regimes applied in the present study. 72
- Figura 4.2.** Average weight (A), length (B), and precocity (C) of different fish populations..... 73
- Figura 4.3.** Linear regression for the rate of spermiating males versus fish weight (A) and length (B) for prepubertal male sea bass assessed during the period of maximum spermiation 74
- Figura 4.4.** Indicators of the maturation process in juvenile male sea bass kept under different 2-month photoperiod regimes of LL.. 76

Figura 4.5. Indicators of the maturation process in juvenile male sea bass kept under different 1-month photoperiod regimes of LL, assessed during February.....	78
---	----

CAPÍTULO 5. ARTÍCULO 2

Figura 5.1. Evolution of somatic growth and condition factor (FC) in juvenile male sea bass.....	98
Figura 5.2. Evolution of testicular development in juvenile male sea bass....	99
Figura 5.3. Brain seabream (GnRH1), chicken-II (GnRH2) and salmon (GnRH3) GnRH content in juvenile male sea bass.....	101
Figura 5.4. Evolution of <i>fshβ</i> and <i>amh</i> expression and mitotic index of spermatogia type A (SPGA) at early gametogenesis in juvenile male sea bass, kept under natural photoperiod (NP), continuous light (LL) from 15 aug to 15 sep in otherwise NP (LLa/s) and LL all the year around (LLy).	103
Figura 5.5. Relative changes in expression of star, <i>erβ1</i> and <i>erβ2</i> in the gonad of juvenile male sea bass	104
Figura 5.6. Changes in plasma levels of E ₂ , 11-KT, T and Fsh in juvenile male sea bass.....	106
Figura 5.7. Summary of the effects of continuous light during the photolabile period at early gametogenesis	111

CAPÍTULO 6. ARTÍCULO 3

Figura 6.1. Schematic representation of the experimental designs and photoperiod regimes for the three independent trials conducted in this study.	128
Figura 6.2. Monthly changes in mean (\pm SEM) body weight, fork length and condition factor during the second annual cycle for male	133
Figura 6.3. Specific growth rates for body weight (GW) and fork length during the second annual cycle for male sea bass.	134
Figura 6.4. Linear regression of male sea bass condition factor versus specific growth rate for weight and rate of precocity versus specific growth rate for length.	135
Figura 6.5. Monthly changes in gonadosomatic index mean values during the second annual cycle of life of male sea bass.....	136

Figura 6.6. Percentage of running sea bass males kept under the different photoperiod regimes	138
Figura 6.7. Traits of the maturation process in male sea bass during the second annual cycle.....	139

LISTADO DE TABLAS

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Estados de desarrollo gonadal de la lubina.....	17
Tabla 1.2. Tipos y características de las células germinales presentes en la espermatogénesis de la lubina	19
Tabla 1.3. Resumen del efecto de otras sustancias que intervienen en el proceso reproductor de peces teleósteos.	32
Tabla 1.4. Resumen de algunas especies de interés acuícola que tienen pubertad prematura en condiciones de cultivo intensivo.....	43

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.1. Características de los cebadores y método de detección empleado para los análisis de expresión génica mediante qRT-PCR.....	63
---	----

CAPÍTULO 5. ARTÍCULO 2

Tabla 5.1. Gene-specific primers and Taqman and SybGreen fluorogenic probes, used in this study for qRT-PCR analysis.	95
---	----

CAPÍTULO 1

INTRODUCCION

1.1 BIOLOGÍA DE LA LUBINA

La lubina europea es una especie marina perteneciente a la clase Actinopterygia, orden Perciformes, familia Moronidae, género *Dicentrarchus* y especie *labrax* (**Fig. 1.1**) (Nelson et al., 2016). Está distribuida a lo largo de toda la vertiente atlántica europea, entre el paralelo 66° N y 13° N, desde Noruega hasta el Senegal, también en el Mediterráneo y en el Mar Negro (**Fig. 1.2**). La lubina (*Dicentrarchus labrax*) puede vivir hasta 12 años y alcanzar un peso de 12 Kg y un tamaño de 100 cm, respectivamente. Es una especie demersal, eurihalina y euriterma (Ruesga, 2005). En invierno suele habitar zonas profundas o alejadas de la costa, pero en verano frecuenta las zonas litorales y puede estar presente en estuarios y ríos cercanos a la costa que utiliza como áreas de alimentación (Kelley, 1986; Costa y Bruxelles, 1989). Los individuos adultos de lubina tienden a ser solitarios, sin embargo, los juveniles forman pequeños cardúmenes (Ruesga, 2005). En su medio natural la lubina se alimenta de una dieta variada que está determinada, en parte, por la disponibilidad geográfica de sus presas, la variedad de hábitat y el tamaño del pez. Entre sus principales alimentos están los crustáceos, decápodos, misidáceos y anfípodos (Cabral y Costa, 2001).



Figura 1.1. Lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) (Tomado de Nelson et al., 2016).



Figura 1.2. Distribución geográfica de la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Tomado de <http://www.aquamaps.org/receive.php>).

1.1.1 Aspectos reproductivos de la lubina

La lubina, al igual que todos los integrantes de la familia Moronidae, es una especie gonocorista. Es decir, tras la eclosión las gónadas están indiferenciadas pero, posteriormente, tras un proceso de diferenciación sexual éstas se convierten en testículos u ovarios, lo que da lugar al desarrollo de un individuo macho o hembra, respectivamente. No obstante, cabe destacar que durante el desarrollo sexual, puede haber individuos machos que desarrollen oocitos intratesticulares, denominándose ovotestes. El inicio del periodo de diferenciación sexual en hembras tiene lugar alrededor de los 275 días post fertilización (DPF), mientras que en machos ésto ocurre alrededor de los 355 días DPF (Blázquez et al., 1996). Los machos de lubina alcanzan la madurez sexual (pubertad) a los dos años de vida, y las hembras a los tres (Roblin y Bruslé, 1983; Blázquez et al., 1995). Sin embargo, en condiciones de cultivo, se ha observado la existencia de una maduración precoz que en el caso de los machos de lubina ocurre durante su primer año de vida y en las hembras, presumiblemente, puede tener lugar durante su segundo año de vida (Carrillo et al., 1995; Brown et al., 2014). La lubina se reproduce una sola vez al año, aunque las hembras al tener un desarrollo ovárico sincrónico por grupos pueden llegar a realizar varias puestas anuales (Carrillo et al., 1995). La época de reproducción varía según el lugar geográfico. En general, en el mar Mediterráneo la época reproductiva tiene lugar durante los meses de invierno, entre diciembre y marzo, con pequeños adelantos o atrasos según las variaciones anuales térmicas del agua. Así pues, en el Mediterráneo noroccidental

(40° LN) durante la época de puesta, el promedio de temperatura suele ser de 12°C con un fotoperiodo de 9-10 horas de luz: 14-15 horas de oscuridad (Carrillo et al., 1995; Prat et al., 1999). Las hembras pueden llegar a expulsar entre 300.000 y 600.000 huevos que los machos fecundan externamente (Navas et al., 1993). Cada huevo puede tener un peso en seco de ~60 µg, que aumenta hasta unos 10 mg durante el desarrollo embrionario. El periodo larvario suele tener una duración de 46 días a 16,5 °C (Houde y Zastrow, 1993).

1.1.2 Estructura y función del testículo

En peces se pueden distinguir dos tipos de testículos; el tubular, formado por una cavidad central, y el lobular, constituido por lóbulos ramificados y anastomosados entre sí (**Fig. 1.3**). El testículo tubular es propio de aquellas especies con fecundación interna, mientras que el lobular es común en aquellas especies con fecundación externa (Billar, 1986; Parenti y Grier, 2004). La lubina, al igual que muchas especies de interés acuícola, posee un testículo lobular en el que se distinguen dos grandes compartimentos, el intersticial y el lobular (**Fig. 1.3**). El compartimento intersticial está formado por células de tejido conectivo continuas con la túnica albugínea (pared del órgano testicular), vasos sanguíneos y linfáticos, macrófagos, mastocitos, fibras nerviosas y células de Leydig (células intersticiales) (Koulish et al., 2002). El compartimento lobular está delimitado por la membrana basal y está constituido por lóbulos en los cuales se pueden observar células mioides peritubulares y un epitelio germinal compuesto por células somáticas de Sertoli y células germinales como las espermatogonias. El epitelio germinal a su vez constituye una unidad funcional denominada espermatociste que puede estar formado por una sola espermatogonia primaria o por varios tipos celulares derivados de ella y que están sustentadas por células de Sertoli. A diferencia de lo que ocurre en el testículo tubular, en el que los espermatocistes migran hacia la región distal durante el proceso espermatogénico, en el lobular no ocurre esta migración (Grier, 1981) y cada lóbulo testicular puede contener varios espermatocistes (Koulish et al., 2002).

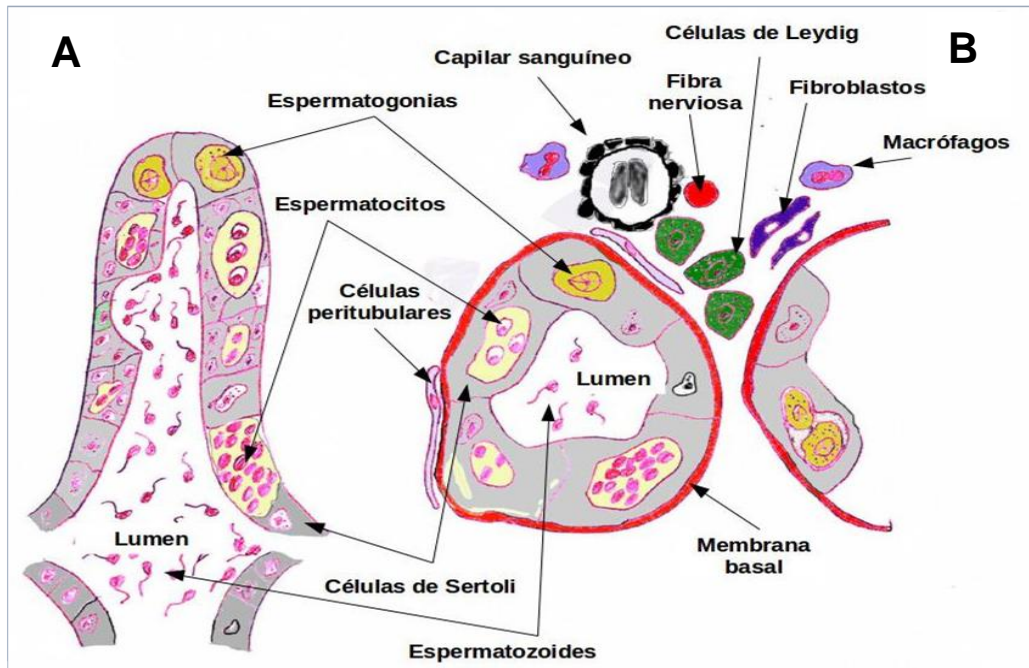


Figura 1.3. Estructura de un testículo tipo lobular en un pez teleosteo. A) lóbulo, B) sección transversal de dos lóbulos durante la espermatogénesis (tomado de Billard et al., 1982 y Nagahama, 1983).

Cada tipo celular que compone el tejido testicular cumple una o más funciones. Las células de Leydig son de gran importancia en el proceso de espermatogénesis. Estas células son las encargadas de producir varias enzimas que están implicadas en la síntesis de esteroides y, por tanto, se las considera como las principales productoras de hormonas esteroideogénicas a nivel gonadal (Yaron y Sivan, 2006). Por otra parte, las células de Sertoli regulan el proceso de espermatogénesis, manteniendo y determinando la supervivencia de las células germinales y por ende la capacidad espermática del testículo. Entre sus funciones están la de segregar fluidos presentes en el lumen tubular, fagocitar células germinales apoptóticas, cuerpos residuales de espermatidas y espermatozoides residuales durante la espermiogénesis (Schulz et al., 2010). A diferencia de lo que ocurre en reptiles, aves y mamíferos, donde las células de Sertoli proliferan hasta la pubertad y son capaces de soportar sucesivos episodios de espermatogénesis y mantener a la vez distintos tipos de células germinales, en peces, las células de Sertoli proliferan incluso cuando el animal es adulto. La espermatogénesis se caracteriza por ser cística y las células de Sertoli son las encargadas de mantener los clones

de las células germinales ubicadas dentro del ciste, encargándose de esta manera de nutrir y sustentar estos cistes (Schulz et al., 2005, 2010).

1.1.3 Pubertad y espermatogénesis en la lubina

La pubertad se define como el periodo de desarrollo durante el cual un individuo madura sexualmente por primera vez y es capaz de reproducirse (Taranger et al., 2010). En peces, se considera que los machos comienzan la pubertad cuando éstos inician la primera espermatogénesis. Es decir, cuando inician por primera vez el proceso de proliferación de las espermatogonias y éstas entran en meiosis y el individuo es capaz de producir gametos maduros (esperma) (Schulz y Miura, 2002). En hembras, el inicio de la pubertad viene marcado con el inicio de la vitelogénesis (Patiño y Sullivan, 2002). Una vez que los espermatozoides se hidratan y tiene lugar la primera espermiación en los machos u ovulación en el caso de las hembras, se considera que la pubertad ha finalizado (Okuzawa, 2002). Está bien documentado que, en el área mediterránea, los machos de lubina alcanzan la pubertad un año antes que las hembras, durante su segundo año de vida mientras que las hembras maduran a los 3-4 años de edad (Carrillo et al., 1995). La diferencia de edad que existe entre ambos sexos en alcanzar la pubertad es común en muchas especies de interés acuícola y generalmente los machos la alcanzan a una talla y edad menor que las hembras. Esta situación se cree que puede ser debida a que la fecundidad y la calidad/supervivencia de la progenie mejoran cuanto mayor talla tiene el pez, lo que presumiblemente es más crítico en el caso de las hembras (Aubin-Horth et al., 2006).

Durante la pubertad, y cada vez que el animal comienza su fase reproductiva, las gónadas sufren un proceso de cambios en el que las células germinales se transforman para dar lugar a los gametos que en el caso de los machos corresponde a la espermatogénesis y en las hembras al de ovogénesis. La duración de estos procesos suele ser más corto en los peces que en mamíferos, aunque dentro del grupo de teleósteos este tiempo puede variar según la especie. En el caso de la lubina, en el Mediterráneo, la duración del proceso espermatogénico puede llegar a alcanzar varios meses desde finales del mes de agosto hasta los meses de enero-febrero (Carrillo et al., 1995). Así pues, cada vez que el animal comienza su fase reproductiva, en sus gónadas se pueden apreciar

una serie de cambios a nivel celular que van asociados a las distintas etapas de su desarrollo gonadal. En el caso de la espermatogénesis se distinguen tres etapas o fases (**Fig. 1.4**): 1) la mitótica, en la que las espermatogonias madres o espermatogonias tipo A proliferan mitóticamente durante varias generaciones para dar lugar a las espermatogonias tipo B y que finalmente se diferenciarán en espermatoцитos primarios. 2) La fase meiótica, durante la cual cada espermatoцитo primario sufre su primera división meiótica dando paso a la aparición de los espermatoцитos secundarios. Los espermatoцитos secundarios suelen tener una vida muy corta y aunque tienen las cromátidas duplicadas, se consideran células haploides ya que cada par de cromátidas comparten el mismo centriolo (Curtis y Barnes, 2008). Posteriormente los espermatoцитos secundarios entran en la segunda división meiótica y se transforman en espermátidas haploides (cada espermatoцитo secundario da lugar a cuatro espermátidas). 3) Por último, durante la fase de espermiogénesis, las espermátidas, que ya no se dividen, sufren una serie de cambios morfológicos tales como la condensación nuclear, la eliminación de orgánulos y citoplasma, la formación del flagelo y la reordenación de los orgánulos celulares en el citoplasma. Estos cambios transforman a cada una de las espermátidas en un espermatozoide (Jamieson, 1991; Miura et al., 2003; Carrillo et al., 2009a; Nóbrega et al., 2009). Cabe destacar que, durante la fase mitótica, el número de espermatogonias incrementa en progresión geométrica y de forma rápida, siendo el número de ciclos celulares que antecede a la primera meiosis, característico de cada especie y está determinado genéticamente (Ando et al., 2000; Schulz et al., 2010). Una vez que se ha completado la espermiogénesis, los espermatozoides se liberan a la luz tubular y de allí al conducto deferente desde donde se liberan al exterior (Schulz et al., 2010). En algunas especies como la lubina, los espermatozoides intracísticos sólo son fértiles una vez han alcanzado el canal deferente (Schulz y Miura, 2002). Si bien el proceso espermatogénico se compone de las tres etapas mencionadas anteriormente, hay que tener en cuenta la observación siguiente. Existe una proliferación espermatogonial que no conduce a la producción de gametos, sino, más bien, a una renovación de las células germinales y/o espermatogoniales. En este sentido, y según la especie, no está claro todavía si este proceso puede ocurrir a través de las divisiones mitóticas o por simple diferenciación celular (Schulz et al., 2010).

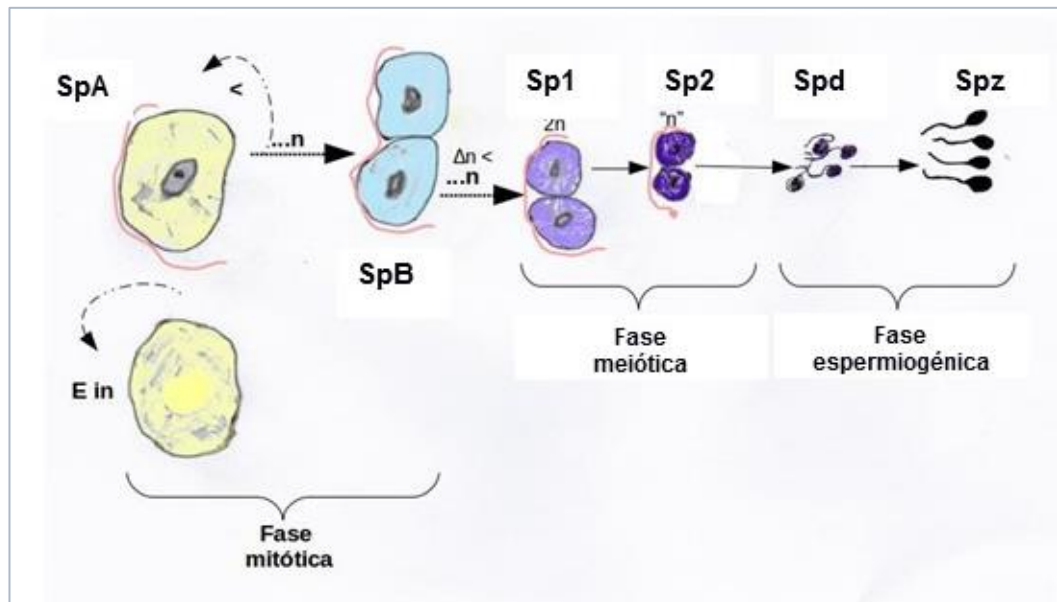


Figura 1.4. Esquema representativo de la espermatogénesis en peces y la presencia de los distintos tipos celulares existentes durante el proceso. Abreviaturas: Ein; espermatogonias o células germinales indiferenciadas, SpA; espermatogonias tipo A, SpB; espermatogonias tipo B, Sp1; espermatocitos primario, Sp2; espermatocitos secundarios, Spd; espermatidas, Spz; espermatozoides, "...n" indica que pueden ocurrir un número distinto de divisiones celulares, " $\Delta n <$ " indica que el tiempo que transcurre entre una división celular y otra es corto y por lo tanto la velocidad del proceso es mayor, $2n$; condición diploide, " n " indica que la célula es haploide (Curtis y Barnes, 2008) (Tomado de Schulz et al., 2010).

A lo largo del proceso de espermatogénesis podemos distinguir diferentes estados de desarrollo gonadal que van asociados a la presencia de distintos tipos de células germinales. Cada generación de espermatogonias se distingue morfológicamente de la anterior principalmente por el aumento de su heterocromatina y una disminución de su tamaño celular y nuclear (Carrillo et al., 2009ab). En la espermatogénesis de la lubina se han descrito seis estados de desarrollo gonadal (Begtashi et al., 2004) (**Tabla 1.1** y **Fig. 1.5**) y hasta ocho tipos celulares de espermatogonias diferentes (**Tabla 1.2**) (Yilmaz, 2006).

Tabla 1.1. Estados de desarrollo gonadal de la lubina y sus principales características (tomado de Begtashi et al., 2004).

Estado de desarrollo gonadal	Características
Estado I	Estado correspondiente al mes de octubre. El testículo se considera inmaduro , pero está completamente diferenciado y se distingue claramente la formación de los túbulos seminíferos. Está formado por abundantes espermatogonias tipo A y se observan los primeros cistes con espermatogonias más tardías.
Estado II	Estado correspondiente al mes de noviembre. Se conoce como una etapa de recrudescencia temprana o maduración temprana del testículo. En este estado se observa la presencia de cistes con espermatogonias tipo A y cistes con espermatogonias tipo B que se hacen más abundantes y comienzan a distribuirse hacia la parte más externa del túbulo. Aparecen también los primeros cistes de espermatocitos que se localizan hacia la parte más interna del testículo y que entrarán en un proceso de división mitótica y posterior meiosis para dar lugar a las primeras espermátidas (Estado III).
Estado III	Estado correspondiente al mes de diciembre. Se conoce como una etapa de recrudescencia media . En esta etapa predominan los cistes de espermatocitos primarios y secundarios, y comienzan a aparecer las primeras espermátidas.
Estado IV	Estado correspondiente al mes de enero. Se conoce como una etapa de recrudescencia tardía , que se caracteriza por la presencia de todos los tipos de células germinales, incluyendo los espermatozoides (espermiogénesis temprana).
Estado V	Estado correspondiente a los meses de febrero y marzo (espermiogénesis activa). El testículo está maduro y son abundantes los espermatozoides en el lumen testicular.
Estado VI	Estado correspondiente al mes de abril. El testículo entra en regresión y en él se pueden observar espermatozoides residuales, fibrocitos y células necróticas o apoptóticas.

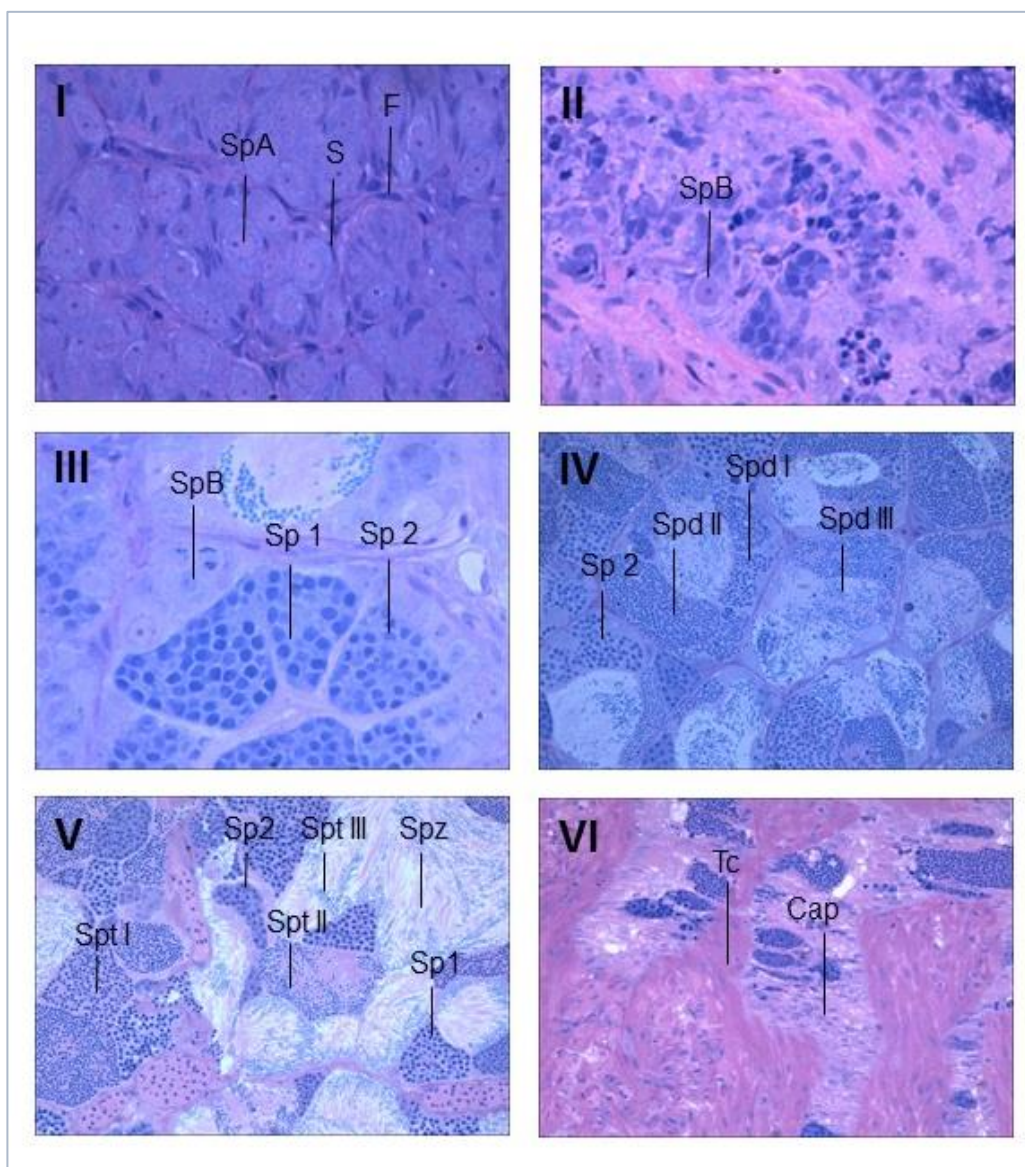


Figura 1.5. Microfotografías de testículos de lubina (*Dicentrarchus labrax*) que muestran los distintos estados del desarrollo gonadal y los tipos celulares más representativos. [I] Estado I; testículo inmaduro pero completamente diferenciado y con abundantes espermatogonias tipo A (SpA). [II] Estado II o recrudescencia temprana; predominan las espermatogonias tipo B (SpB). [III] Estado III; se aprecian cistes de espermatocitos primarios (Sp1) y secundarios (Sp2), y las primeras espermatidas (Spd I). [IV] Estado IV o recrudescencia tardía; también denominado espermiogénesis temprana, se pueden apreciar todos los tipos de células germinales incluyendo las espermatidas secundarias (Spd II), terciarias (Spd III), y los espermatocitos (Spz). [V] Estado V o espermiogénesis activa; se pueden apreciar abundantes espermatozoides en el lumen de los lóbulos. [VI] Estado VI o de regresión; se observan muy pocos espermatozoides (residuales) y se observan células apoptóticas (Descripciones de acuerdo con Begtashi et al., 2004 y Yilmaz, 2006). Fotos cedidas amablemente por M. Carrillo y S. Zanuy. Abreviaturas: S (células de Sertoli), F (fibrocitos), Tc (tejido conectivo) y Cap (cuerpos apoptóticos).

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN

Tabla 1.2. Tipos y características de las células germinales presentes en la espermatogénesis de la lubina (Tomado de Zanuy et al., 1999; Rodríguez et al., 2001ab, Begtashi et al., 2004; Yilmaz, 2006).

Tipo celular	Morfología	Tamaño (μm)	Ubicación	Origen
Espermatogonia A (SpA)	Forma redondeada	Célula: $12,60 \pm 0,20$ Núcleo: $9,50 \pm 0,11$	Lóbulos testiculares	Derivan por mitosis de células germinales
Espermatogonia B1 (SpB1)	Forma redondeada	Célula: $9,00 \pm 0,08$ Núcleo: $6,76 \pm 0,05$	En cistes dentro de los lóbulos testiculares	Derivan por mitosis de las SpA
Espermatogonia B2 (SpB2)	Extensos espacios intercelulares	Tamaño intermedio entre SpB1 y SpB3	En cistes dentro de los lóbulos testiculares	Derivan por mitosis de las SpB1
Espermatogonia B3 (SpB3)	Extensos espacios intercelulares	Célula: $6,80 \pm 0,06$ Núcleo: $4,86 \pm 0,05$	En cistes dentro de los lóbulos testiculares	Derivan por mitosis de las SpB2
Espermatogonia B4 (SpB4)	Extensos espacios intercelulares (tinción muy intensa)	Célula: $6,34 \pm 0,06$ Núcleo: $4,75 \pm 0,05$	En cistes dentro de los lóbulos testiculares	Derivan por mitosis de las SpB3
Espermatogonia B5 (SpB5)	Extensos espacios intercelulares (tinción muy intensa)	Tamaño intermedio entre SpB4 y SpB6	En cistes dentro de los lóbulos testiculares	Derivan por mitosis de las SpB4
Espermatogonia B6 (SpB6)	Extensos espacios intercelulares (tinción muy intensa)	Célula: $5,01 \pm 0,05$ Núcleo: $3,96 \pm 0,05$	En cistes dentro de los lóbulos testiculares	Derivan por mitosis de las SpB5
Espermatogonia B7 (SpB7)	Extensos espacios intercelulares (tinción muy intensa)	Célula: $4,76 \pm 0,04$	En cistes dentro de los lóbulos testiculares	Derivan por mitosis de las SpB6
Espermatocitos primarios (Sp1)	Forma redondeada con presencia de grumos de cromatina	Célula: entre $4,33 \pm 0,4$ y $3,91 \pm 0,03$	Dentro de los cistes germinales	Aparecen durante la primera división meiótica (leptonema-zigonema-diplonema) de las SpB7
Espermatocitos secundarios (Sp2)	Forma redondeada cromatina irregularmente condensada	Célula: $3,28 \pm 0,03$	Dentro de los cistes germinales	Derivan de la segunda división meiótica de las SpB7
Espermátidas primarias (Spt I)	Presencia de un flagelo y núcleo con forma redondeada	Célula: $2,62 \pm 0,02$	Dentro de los cistes germinales	Derivan de la meiosis II de los Sp2
Espermátidas secundarias (Spt II)	Presencia de un flagelo y núcleo con forma de media luna	Célula: $2,42 \pm 0,02$	Dentro de los cistes germinales	Por transformación de las Spt I
Espermátidas terciarias (Spt III)	Presencia de un flagelo y núcleo completamente elongado	Célula: $2,00 \pm 0,02$	Dentro de los cistes germinales	Por transformación de las Spt II
Espermatozoides (Spz)	Presencia de grandes flagelos, y el núcleo tiene forma arriñonada	Célula: $1,61 \pm 0,02$	Fuera de los cistes germinales	Derivan directamente de las espermátidas
Cuerpos apoptóticos	Baja tinción posee un color azul oscuro intenso	Similar al de las células geminales	En lo cistes germinales o individuales	Son células germinales muertas

1.2 LA REPRODUCCIÓN EN PECES: EJE CEREBRO-HIPÓFISIS-GÓNADA

La reproducción de los peces es un proceso que está regulado tanto por señales externas (ambientales) como internas del organismo, las cuales tienen una naturaleza genética y endocrina (Carrillo et al., 2009ab). El cerebro es el órgano integrador de dichas señales. A él llega la información ambiental que transducida por los receptores sensoriales provoca la liberación de neuropéptidos. En el caso de la señal lumínica, la respuesta neuropeptídica tiene lugar a través de la glándula pineal, un órgano que es capaz de transducir los cambios fotoperiódicos percibidos por el animal en una respuesta endocrina y fisiológica (Falcón et al., 2007). Los neuropéptidos promueven a su vez una cascada jerárquica de carácter endocrino a lo largo del denominado eje cerebro-hipófisis-gónada (eje reproductivo). En peces, esta cascada endocrina tiene como principales ejecutores a las hormonas liberadoras de gonadotrofinas (GnRH), producidas en el hipotálamo, y las hormonas gonadotropas o gonadotropinas, constituidas por la hormona luteinizante (Lh) y la hormona estimuladora del folículo (Fsh), sintetizadas ambas en la hipófisis y por último, y no por eso menos importantes, los esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos y progestinas) que son sintetizados en las gónadas. Los esteroides ejercen su acción sobre sus tejidos diana, pero también pueden actuar como reguladores de la propia cascada endocrina participando así en distintos mecanismos de retroalimentación, positivos y/o negativos a lo largo del eje reproductivo (Schulz et al., 2010). Si bien en términos generales, todos estos componentes son factores claves en el control de la reproducción en vertebrados incluyendo los peces, hay que decir que en los últimos 15 años, la forma de entender el control neuroendocrino de la reproducción ha dado un vuelco gracias al descubrimiento de nuevos neuropéptidos que ejercen papeles importantes en la regulación de este eje, el sistema kisspeptina y el sistema GnRH (Felip et al., 2009; Elizur, 2009; Carrillo et al., 2009b, 2015; Pineda et al., 2010; Tena-Sempere et al., 2012; Escobar et al., 2013ab; Paullada-Salmerón et al., 2016). En el caso de la lubina se han identificado ambos sistemas y mientras el primero de ellos se ha caracterizado por ejercer una acción activadora del eje reproductivo (Felip et al., 2009; Espigares et al., 2015b), el

segundo tiene una acción represora sobre el eje reproductivo (Paullada-Salmerón et al., 2016).

A continuación, se describen con un poco más de detalle aquéllos componentes claves que participan en el control del proceso reproductor en peces.

1.2.1 Hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH)

Existen más de 24 isoformas de péptidos conocidos como hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). La GnRH está presente en vertebrados, protocordados e invertebrados. De éstas 24 isoformas, 6 son específicas de peces teleósteos; GnRH del salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*) (sGnRH; Sherwood et al., 1983), GnRH de pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) (cfGnRH; Bogerd et al., 1992; Ngamvongchon et al., 1992), GnRH de dorada (*Sparus aurata*) (sbGnRH; Powell et al., 1994), GnRH de arenque del pacífico (*Clupea harengus pallasii*) (hrGnRH; Carolsfeld et al., 2000), GnRH de medaka (*Oryzias latipes*) o pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) (mdGnRH, Okubo et al., 2000: pjGnRH, Montaner et al., 2001) y GnRH de corégono (*Coregonus clupeaformis*) (wfGnRH; Adams et al., 2002). Sin embargo, de acuerdo con el análisis filogenético de las diferentes secuencias de GnRH obtenidas y su localización cerebral, las distintas variantes de GnRH de peces se han clasificado en tres tipos. La GnRH-1, que es la forma hipofisiotrópica de GnRH y se expresa principalmente en el hipotálamo y el área preóptica de vertebrados. La GnRH-2 de pollo, que se expresa de manera conservada en el sinencéfalo/mesencéfalo de todos los vertebrados, y la GnRH-3 o también conocida como GnRH de salmón, que se ha identificado en el cerebro anterior de peces (White et al., 1995; Fernald y White, 1999; Muñoz-Cueto, 2013). En peces perciformes estas tres formas se denominan como sbGnRH (GnRH-1), cGnRH-II (GnRH-2) y sGnRH (GnRH-3), respectivamente (Powell et al., 1994; White et al., 1995; Gothilf et al., 1996; Senthilkumaran et al., 1999).

En términos generales cabe mencionar que las GnRH son capaces de estimular la liberación de las gonadotropinas (Dickey y Swanson, 2000), aunque también hay estudios que indican que son capaces de intervenir en la síntesis de las subunidades α y β de las gonadotropinas, tanto de la Lh como de la Fsh (Dickey

y Swanson, 2000; Mateos et al., 2002; Yaron et al., 2003). Sin embargo, su efecto estimulador varía según el tipo de GnRH y está determinado en parte por sus diferentes tasas de degradación enzimática, vida media, su afinidad por los distintos tipos de receptores o su eficiencia en la activación de las rutas intracelulares de segundos mensajeros (Zohar et al., 1995). En peces perciformes, los distintos estudios realizados han demostrado que la sbGnRH-I es la principal hormona hipofisiotrópica que regula la síntesis y secreción de las gonadotropinas. Sin embargo, existen excepciones, como es el caso del ciprínido *Pimephales promela* (Filby et al., 2008) y el pez cebra (*Danio rerio*) (Kitahashi et al., 2009) donde la sGnRH-III parece ser la forma hipofisiotrópica. En peces teleósteos, la sGnRH-III y la cGnRH-II desempeñan usualmente funciones de neurotransmisión, neuromodulación de sistemas sensoriales y somomotores (Umino y Dowling, 1991; Behrens et al., 1993; Fernald y White, 1999) y funciones de control de la conducta reproductiva (Zohar et al., 1995; Volkoff y Peter, 1999; White et al., 2002). De hecho, se ha observado que la cGnRH-II actúa como un factor liberador de melatonina en la glándula pineal de la lubina (Servili et al., 2010).

A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, donde el hipotálamo se conecta con la hipófisis a través de un sistema portal, en el caso de los peces teleósteos esta conexión se realiza a través de fibras nerviosas que penetran por el tallo hipofisario hasta llegar a la hipófisis. En peces se han identificados 5 tipos de receptores de GnRH que se denominan de la siguiente manera: tipo II-1a, II-1b, II-1c, II-2a y II-2b (Kah et al., 2007). Todos ellos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y presentan distintas afinidades por sus ligandos (Kah et al., 2007). En peces, los receptores de GnRH también se expresan en el cerebro y otros tejidos como las gónadas, el hígado o el riñón, y se ha sugerido que las GnRH pueden actuar como neurotransmisores y/o neuromoduladores en el cerebro pero también como factores autocrinos o paracrinos a nivel gonadal (Habibi y Pati, 1993, Yu et al., 1998).

1.2.2 Gonadotrofinas

Las gonadotrofinas denominadas genéricamente como GTHs, se sintetizan en la hipófisis. Existen dos tipos de GTHs, la hormona estimuladora del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Ambas son las encargadas de controlar la reproducción en ambos sexos en vertebrados y por tanto también en peces

(Rocha, 2008). Durante mucho tiempo se creyó que en peces sólo existía un tipo de GTH, sin embargo, hoy en día tanto la Fsh como la Lh (denominadas inicialmente como GTHI y GTHII, respectivamente) se han identificado en varias especies de teleósteos (Carrillo et al., 2010) pertenecientes a distintos órdenes tales como anguiliformes (Kamei et al., 2005), salmoniformes (Suzuki et al., 1988ab), cipriniformes (Van Der Kraak et al., 1992), cyprinodontiformes (Shimizu y Yamashita, 2002), perciformes (Molés et al., 2008) y pleuronectiformes (Weltzien et al., 2003).

Tanto la LH como la FSH son heterodímeros de naturaleza glicoprotéica y están formadas por dos subunidades, α y β . La subunidad α es común para la FSH y la LH. Sin embargo, la subunidad β es distinta para ambas gonadotropinas y es la que determina la especificidad biológica de cada una de estas hormonas (Boime y Ben-Menahem, 1999). Cada subunidad por separado no tiene actividad biológica y para conseguir esta actividad es necesario que el heterodímero se mantenga intacto α/β (Pierce y Parsons, 1981).

En machos, las GTHs actúan principalmente a nivel testicular y son consideradas las hormonas más importantes en la regulación de la fisiología testicular. Ejercen su efecto en dos procesos claves e interdependientes, la esteroidogénesis y la producción de espermatozoides (Rocha, 2008). En machos tanto la Fsh como la Lh controlan la producción de esteroides sexuales, de hecho, estudios *in vivo* e *in vitro* en salmón han demostrado el efecto esteroidogénico que las gonadotropinas ejercen en esta especie (Sakai et al., 1989; Swanson et al., 1989; Planas y Swanson 1995; Kagawa et al., 1998; Maugars y Schmitz, 2008). Asimismo, también se ha observado que en muchas especies existe una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de los esteroides gonadales y los niveles plasmáticos de Fsh y Lh durante la maduración sexual (Swanson, 1991) y la producción de 17β -estradiol (E_2) durante la vitelogénesis (Van Der Kraak et al., 1992; Okada et al., 1994; Suzuki et al., 1988c). En hembras de trucha común (*Salmo trutta*), la Fsh ejerce también una acción reguladora sobre la conversión de testosterona (T) a E_2 , incrementando la actividad aromatasa y la expresión del gen *P-450arom* en el ovario (Montserrat et al., 2004).

El control que ejercen las gonadotropinas sobre la síntesis de esteroides se lleva a cabo a través de la interacción con los receptores de las gonadotropinas,

Lhr y Fshr. Sin embargo, en peces se desconoce si esta acción es de forma directa a través de su receptor en las células de Leydig, o si por el contrario se lleva a cabo de forma indirecta uniéndose a sus receptores en las células de Sertoli y posteriormente a través de una acción paracrina como ocurre en mamíferos (Lejeune et al., 1998). En especies como la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*), salmón amago (*Oncorhynchus rhodurus*) (Oba et al., 2001), anguila japonesa (*Anguilla japonica*) (Ohta et al., 2007), pez cebra (García-López et al., 2010) y lenguado (*Solea senegalense*) (Chauvigné et al., 2012) se ha demostrado la existencia del Fshr tanto en las células de Sertoli como de Leydig, mientras que en las hembras su expresión se ha observado en las células de la teca y granulosa. Cabe destacar que, hasta el momento, en la lubina no se ha demostrado la presencia del Fshr en las células de Leydig (Molés et al., 2007). Con respecto al *Lhr*, en machos de salmón se expresa únicamente en las células de Leydig, mientras que en hembras sólo en las células de la granulosa (Miwa et al., 1994; Oba et al., 2001). No obstante, en peces, el *Lhr* también se expresa en tejidos diferentes al gonadal tales como el riñón cefálico, músculo, cerebro, vesícula seminal, hígado, corazón, estómago y branquias (Oba et al., 1999; Bogerd et al., 2001; Kumar et al., 2001; Vischer y Bogerd, 2003; Kwok et al., 2005; Maugars y Schmitz, 2006; Rocha et al., 2007). A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, donde la interacción de la LH y la FSH con sus receptores es altamente específica, en peces esta especificidad es menor, y ambas hormonas pueden unirse a sus receptores indistintamente bajo determinadas condiciones fisiológicas. Estudios realizados con el pez gato africano (García-López et al., 2008), pez gato americano (Kumar et al., 2001), anguila japonesa (Kazeto et al., 2008), pez cebra (So et al., 2005) y lenguado (Chauvigné et al., 2012) han demostrado que el receptor Fshr puede ser activado por altos niveles fisiológicos de Lh, como los que se detectan durante la época de desove. En cambio, la activación del receptor de la Lh por parte de la Fsh sólo ocurre cuando los niveles de esta hormona alcanzan valores que superan notablemente los niveles fisiológicos (Schulz et al., 2010). Este patrón de promiscuidad entre ligando-receptor puede ser diferente según la especie. De hecho, en el caso de la lubina, se ha demostrado que la especificidad del ligando por su receptor es significativamente mayor en comparación con otras especies (Molés et al., 2011a).

1.2.3 Esteroides sexuales

Los esteroides son hormonas que juegan un papel muy importante en el sistema endocrino. Se sintetizan intracelularmente a partir del colesterol (Wade, 2004). En términos generales, se distinguen tres tipos de esteroides, aquéllos cuyas moléculas están formadas por 21 átomos de carbono (C_{21}), a los que pertenecen los corticoesteroides y las progestinas, los que poseen 19 átomos de carbono (C_{19}) como los andrógenos, y los que están formados por 18 átomos de carbono (C_{18}) como los estrógenos (**Fig. 1.6**). Todos los esteroides, a excepción de los corticoides, están implicados directamente en el proceso de reproducción de todos los vertebrados, y a pesar de sus diferentes niveles plasmáticos según el sexo de los individuos, tanto los andrógenos como los estrógenos se sintetizan en ambos sexos pudiendo desempeñar distintas funciones (Rocha, 2008). En peces, los esteroides sexuales se producen principalmente en las gónadas, sin embargo, también pueden ser sintetizados en otros órganos como el riñón cefálico y el cerebro (Piferrer, 2009). En machos, las células de Leydig son el principal tipo celular productor de esteroides, mientras que en las hembras son las células de la granulosa y la teca las encargadas de sintetizar los andrógenos y estrógenos, respectivamente (Nagahama, 1994). Los esteroides sexuales ejercen un efecto de retroalimentación ("feedback"), positivo y/o negativo, sobre las hormonas gonadotropas, afectando de modo diferencial la expresión, síntesis y liberación de la Fsh y Lh, según la especie. Sin embargo, también pueden afectar la síntesis de GnRH (Peng et al., 1993). En este sentido, se ha demostrado que los esteroides sexuales pueden modular el efecto estimulador e inhibitorio de la dopamina y del ácido γ -aminobutírico, respectivamente (Peng et al., 1993). Adicionalmente, se ha observado también que actúan a nivel gonadal, regulando la síntesis de ellos mismos, probablemente a través de mecanismos que afectan la actividad de las enzimas esteroideogénicas (Antonopoulou et al., 1999; Govoroun, et al., 2001; McQuillan et al., 2003). A continuación, se describe con más detalle las principales hormonas esteroideas implicadas en el proceso reproductivo en peces.

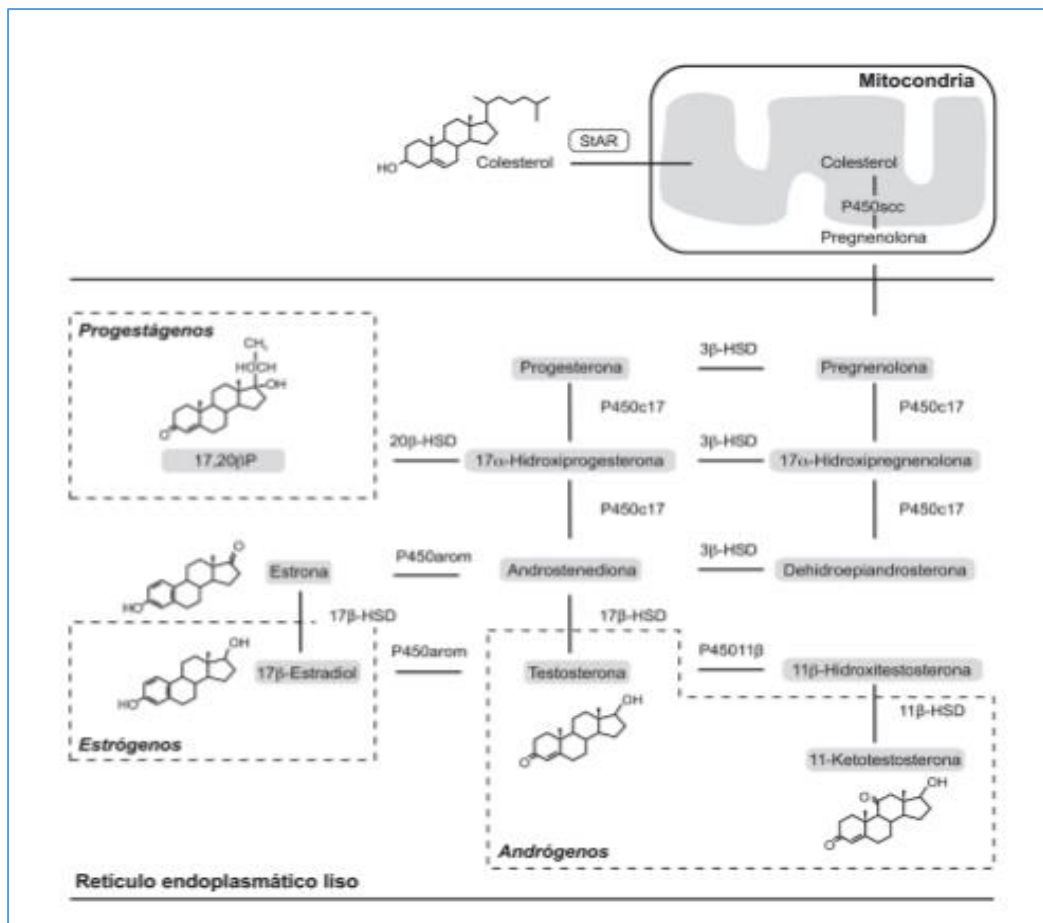


Figura 1.6. Ruta de biosíntesis de los esteroides gonadales en peces teleósteos. Proteína reguladora de la respuesta esteroidogénica aguda (StAR); enzima P450 de la escisión de la cadena lateral de colesterol (P450scc); 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa (P450c17); 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ 5- Δ 4-isomerasa (3 β -HSD); 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 β -HSD); 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD); 20 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (20 β -HSD); P450 aromatasa (P450arom); P450 11 β -hidroxilasa (P45011 β); 17 α ,20 β -hidroxi-4pregnen-3-ona (17,20 β P). Las áreas con líneas discontinuas delimitan los esteroides predominantes en plasma de teleósteos (Tomado de Molés, 2011).

1.2.3.1 Progestinas

Las progestinas son hormonas que pueden actuar como feromonas, sin embargo, se les atribuye principalmente la regulación del proceso de maduración de los oocitos, la fertilidad de los huevos y la ovulación en todas aquellas especies con fertilización interna (Schulz et al., 2010). En teleósteos, se sabe que juegan un papel en el proceso reproductivo de los machos, de hecho, la 17 α , 20 β trihidroxi-4-pregnen-3-ona (20 β -S) o 17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20 β P) o DHP está involucrada en el proceso espermatogénico (Miura et al., 2006; Scott et al., 2010; Chen et al., 2013; Liu et al., 2014). En peces, las

progesterinas actúan uniéndose a receptores específicos que se expresan en las gónadas y que están unidos a la membrana celular y nuclear de las células (Todo et al., 2000; Zhu et al., 2003). Estos receptores pueden ser de dos tipos: un receptor nuclear (Pgr) que actúa como un factor de transcripción ligando-dependiente y el cual regula la expresión de genes diana (Conneely et al., 2002; Jacobsen y Horwitz, 2012), y un segundo receptor (mPgr) formado por 3 subtipos (α , β , γ) asociado a la membrana celular que está involucrado en mecanismos no genómicos (Thomas et al., 2006; Thomas, 2008; 2012). En el salmón del atlántico (*Salmon salar*) (Chen et al., 2011), bacalao del atlántico (*Gadus morhua*) (Chen et al., 2012), y la tilapia del Nilo (Liu et al., 2014) el *pgr* se expresa únicamente en las células de Sertoli que dan soporte a las espermatogonias y espermatidas. Sin embargo, este patrón de expresión puede ser diferente según la especie y la etapa del desarrollo gonadal (Chen et al., 2010, 2012).

1.2.3.2 Andrógenos

Los andrógenos regulan el crecimiento gonadal y el desarrollo de caracteres sexuales secundarios en machos. En ambos sexos tienen un efecto sobre el comportamiento animal y sobre determinados procesos fisiológicos a nivel del hipotálamo y la hipófisis. Los andrógenos como la T y la 11-cetotestosterona (11-KT), pueden afectar la expresión de un gran número de genes. Se cree que más de 155 genes están regulados por este tipo de hormonas, en su mayoría involucrados en el proceso de esteroidogénesis y espermatogénesis, también ciertos factores de transcripción que intervienen en la determinación y la diferenciación sexual, crecimiento celular y control del ciclo celular, entre otros (Le Gac et al., 2008; Schulz et al., 2010). Los andrógenos se unen a dos subtipos de receptores (α y β) que se expresan principalmente en las células de Sertoli e intersticiales de las gónadas de los peces (Takeo y Yamashita, 1999; Todo et al., 1999; Ikeuchi et al., 2001). Diversos estudios efectuados en el salmón del atlántico (Antonopoulou et al., 1999), salmón plateado (Dickey y Swanson, 1998), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Saligaut et al., 1998) y dorada europea (Holland et al., 1998), entre otras especies de peces, han demostrado que la T y la 11-KT estimulan la síntesis de Lh y en menor medida de la de Fsh (Dufour et al., 2000).

1.2.3.3 Estrógenos

Los estrógenos juegan un papel muy importante en las hembras, estimulando el crecimiento gonadal y el desarrollo de caracteres sexuales secundarios, siendo el E₂ una de las hormonas más importantes en el proceso de oogénesis (Specker y Sullivan, 1994; Tyler et al., 2000; Melamed y Sherwood, 2005). Su función principal es la estimulación de la síntesis de vitelogenina (Vtg) en el hígado, una fosfolipoproteína precursora del vitelo de los huevos (Rocha, 2008). Si bien en vertebrados los estrógenos son considerados como hormonas típicas del sexo femenino, en peces se han detectado también en el plasma de machos (Amer et al., 2001). Los estrógenos son capaces de regular genes a nivel testicular que son importantes para el proceso espermatogénico (Pinto et al., 2006). Estudios realizados en trucha (Trinh et al., 1986), anguila (Quérat et al., 1991), salmón (Dickey y Swanson, 1998), perca (*Perca flavescens*) (Huggard et al., 1996) y lubina europea (Mateos et al., 2002) han demostrado que el E₂ es capaz de estimular la síntesis de Lh, sin embargo, al igual que ocurre con otros esteroides, este efecto puede variar según la especie y el estado de desarrollo gonadal del animal.

Los estrógenos ejercen su acción mediante su unión a receptores nucleares (Esr), los cuales pueden actuar como factores de transcripción (Mangelsdorf et al., 1995) y a receptores de membrana (Gper), los cuales activan de forma rápida y no genómica, mecanismos de señalización intracelular (Nelson y Habibi, 2013). En peces, se han identificado al menos tres subtipos de receptores nucleares de estrógenos Esr1, Esr2a (también llamado Erβ2), y Esr2b (o Erβ1) (Hawkins et al., 2000; Ma et al., 2000; Menuet et al., 2002; Halm et al., 2004; Muriach et al., 2008ab), y dos Gper; Gpera y Gperb (Lafont et al., 2016). Las diferentes formas de los receptores Erβ1, Erβ2, Gpera y Gperb surgieron como consecuencia de la duplicación del genoma (3R) que ocurrió en el linaje de los teleosteos (Hawkins et al., 2000; Lafont et al., 2016). En peces, los receptores de estrógenos se expresan en diferentes tejidos como riñón, hígado, cerebro, hipófisis y gónadas (Menuet et al., 2002; Choi y Habibi, 2003; Teves et al., 2003; Halm et al., 2004). Sin embargo, su localización, particularmente en las gónadas, varía según la especie. Por ejemplo, en la corvina amarilla (*Larimichthys crocea*) (Chen et al., 2015), el pez gato (Wu et al., 2001) y el lenguado (Chauvigné et al., 2014), los receptores de estrógenos se expresan en células germinales como las

espermatogonias, espermatoцитos y espermátidas y también en las células de Leydig. En otras especies como el gobio común japonés (*Acanthogobius flavimanus*) (Ito et al., 2007) y el zoárcido (*Zoarces viviparus*) (Andreassen et al., 2003) solamente en las células de Sertoli. En el caso de la lubina europea se ha observado que el receptor de membrana *gpera* tiene una mayor expresión que el *gperb* en el cerebro y la hipófisis, tanto en individuos machos como hembras, lo que hace suponer que este receptor media las acciones rápidas de los estrógenos en dichos tejidos. De hecho, durante la espermatogénesis, se ha observado un incremento significativo del *gpera* en hipófisis, desde la recrudescencia media hasta la tardía, mientras que su expresión es constante durante la espermiación. Estos patrones de expresión hacen suponer que este receptor puede regular la síntesis de gonadotropinas. Por otro lado, se ha demostrado que los receptores de estrógenos *erb1* y *erb2* se expresan en todas las células germinales, pero sobre todo en las espermatogonias y los espermatoцитos (Viñas y Piferrer, 2008).

1.2.4 Kisspeptinas

Las kisspeptinas son moléculas de naturaleza peptídica que junto a su receptor (GPR54), juegan un papel importante en la fisiología reproductiva de los mamíferos (Tena-Sempere et al., 2012). Entre sus funciones está la de actuar o intervenir en la diferenciación sexual del cerebro, la activación temporal de la pubertad (Seminara et al., 2003), la regulación metabólica de la fertilidad, el control de la secreción de las gonadotropinas (Castellano et al., 2006), así como ejercer de mediadoras de los estímulos ambientales, los factores metabólicos además de jugar un papel importante en los mecanismos de retroalimentación por parte los esteroides gonadales (Tena-Sempere, 2006; Pinilla et al., 2012; Alvarado et al., 2015, 2016). En mamíferos, existe un único gen que codifica para la kisspeptina y un sólo gen para su receptor (Tena-Semper et al., 2012). En cambio, en el resto de los vertebrados no mamíferos, se ha observado que existen, al menos, hasta 2 genes diferentes que codifican para el ligando, *kiss1* y *kiss2*, pudiendo existir hasta una tercera forma y hasta 4 genes que codifican para su receptor *gpr54* (Biran et al., 2008; Van Aerle et al., 2008; Moon et al., 2009). En el caso de los peces, la mayoría de las especies estudiadas presentan 2 genes *kiss*, y en aquellos casos donde sólo existe una forma, usualmente la forma *kiss2*, sólo tienen un gen que codifica para el receptor (*gpr54-2b*) (Tena-Semper et al., 2012). En algunas especies como la medaka, el pez cebra, el carpín dorado y la lubina

Europea el sistema kisspeptina está duplicado y se ha demostrado que poseen dos genes que codifican para el receptor de las kisspeptinas, *gpr54-1b* (o *kissr2*) y *gpr54-2b* (o *kissr3*) (Alvarado et al., 2013; Biran et al., 2008; Escobar et al., 2010; 2013ab; Felip et al., 2009, 2015; Lee et al., 2009; Li et al., 2009).

Desde el punto de vista reproductivo, los diversos estudios que han evaluado la expresión de los genes *kiss* y *gpr54* en el cerebro de peces proponen al sistema kisspeptina como uno de los principales reguladores de la pubertad (Tena-Semper et al., 2012). Su expresión génica varía según la especie, el sexo y el estado de desarrollo del pez (Parhar et al., 2004; Filby et al., 2008; Selvaraj et al., 2010; Mechaly et al., 2010, 2012; Migaud et al., 2012; Alvarado et al., 2013). También se ha demostrado que las kisspeptinas afectan la expresión de los genes que codifican para las GnRH así como a la secreción de estas hormonas, aunque los resultados varían según la especie de la que se trate (Filby et al., 2008; Felip et al., 2009; Kitahashi et al., 2009; Tena-Sempere et al., 2012; Espigares et al., 2015a). Además, se ha demostrado que la administración intraperitoneal de kisspeptina provoca un aumento significativo de la liberación plasmática de Lh y Fsh en machos prepúberes de lubina (Felip et al., 2009) y también en la perca (Li et al., 2009). Asimismo, la inyección intracraneal de Kiss2-12 promueve la expresión del receptor *kiss2r* y disminuye la expresión de los genes *gnrh1r* y *gnrh2r* en la lubina, lo que va acompañado de un incremento de los niveles plasmáticos de Lh, T y 11-KT (Espigares et al., 2015a). Todos estos hallazgos demuestran la capacidad de las kisspeptinas para activar el eje gonadotrópico y de hecho se ha sugerido como un posible factor regulador del comienzo de la pubertad en vertebrados incluyendo los peces (Carrillo et al., 2015).

1.2.5 Melatonina

La melatonina es una hormona que en mamíferos tiene un alto rango de efectos fisiológicos, pero entre sus principales funciones destacan aquellas relacionadas con la regulación del ciclo del sueño, el desarrollo de la pubertad y las adaptaciones estacionales (Emet et al., 2016). En peces, la melatonina es capaz de afectar no sólo los ritmos diarios del descanso, la ingesta de alimento o el metabolismo, sino también los procesos anuales tales como la esmoltificación (en el caso de los salmones migratorios), el crecimiento y la reproducción (Falcon et al., 2007). En general, en todos los vertebrados los patrones de producción de

melatonina suelen ser más altos durante la noche y más bajos durante el día. En peces la melatonina puede ser producida en la retina, en la glándula pineal o en ambos órganos (Migaud et al., 2007). Sin embargo, se considera que la glándula pineal es la principal fuente de la melatonina plasmática, mientras que la melatonina producida en la retina tiene un efecto más autocrino, afectando igualmente la modulación de neurotransmisores, la actividad eléctrica neuronal y el movimiento retino-motor (Besseau et al., 2006; Siu et al., 2006; Ping et al., 2008; Sauzet et al., 2008; Falcon et al., 2010). La melatonina se une a tres tipos de receptores *Mt1*, *Mt2* y *Mel1c* (Falcon et al., 2007). Los receptores *Mt1* y *Mt2* se expresan en la retina y en el cerebro, así como en distintos tejidos periféricos como el riñón, el intestino, las células sanguíneas, las agallas y las gónadas, mientras que el *Mel1c* sólo se expresa en la retina y la piel (Kulczykowska et al., 2006; Park et al., 2006; Sauzet et al., 2008; Confente et al., 2010). Desde un punto de vista reproductivo, se considera que la melatonina actúa como una hormona integradora de la señal fotoperiódica percibida por el pez y la cascada endocrina que regula la reproducción (Bayarri et al., 2010). De hecho, experimentos *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la melatonina es capaz de afectar a ciertas hormonas claves del proceso reproductivo. Estudios en anguila han demostrado que la melatonina disminuye la expresión de las subunidades- β de las gonadotropinas, así como los niveles plasmáticos de la 11-KT (Sébert et al., 2008). En la carpa, es capaz de inhibir la liberación de dopamina durante el periodo reproductivo de esta especie (Popek et al., 2005). También en la lubina europea, se ha demostrado que la melatonina afecta la expresión de *gnrh1*, *gnrh3*, y sus receptores (Servili et al., 2013), así como de los transcritos de las kisspeptinas (Alvarado et al., 2015). Todos estos hallazgos proponen a la melatonina como un elemento clave entre la integración de las señales ambientales (fotoperiodo) que perciben los peces y la activación del eje reproductor en este grupo de vertebrados.

1.2.6 Aminoácidos y otras hormonas de importancia en el proceso reproductivo en peces

Existen también otras sustancias y/o genes, no menos importantes, que pueden actuar como neurotransmisores y modular el proceso reproductor en peces, o participar directamente en la síntesis de esteroides o en los procesos de proliferación y diferenciación de las células germinales (Miura et al., 1995; Loir,

1999; Schulz et al., 2010). Hasta ahora, los estudios realizados han demostrado que algunas de estas sustancias son capaces de estimular la liberación de las gonadotropinas, bien sea de forma directa actuando a nivel de la hipófisis (Himick et al., 1993; Kah et al., 1993; Trudeau, 1997; Peyon et al., 2001) o indirectamente, modulando los efectos inhibidores del neuropéptido dopamina o de las células dopaminérgicas (Peter et al., 1991; Trudeau, 1997) o estimulando la liberación de GnRH (Trudeau, 1997; Mañanós et al., 1999). Algunas de estas sustancias pueden tener un efecto múltiple, es decir, son capaces de estimular tanto la liberación de GnRH como de gonadotropinas (Kah et al., 1992; Trudeau, 1997; Mañanós et al., 1999). Sin embargo, sus efectos moduladores pueden variar según el estado de desarrollo sexual de los animales y el sexo (Himick et al., 1993; Mañanós et al., 1999; Peyon et al., 2001). A continuación, se hace un resumen de algunas de estas sustancias indicando su implicación e importancia en el proceso reproductivo (**Tabla 1.3**)

Tabla 1.3. Resumen del efecto de otras sustancias que intervienen en el proceso reproductor de peces teleósteos.

Aminoácido o péptido	Función reproductiva	Referencias
Ácido γ-amino butírico (GABA)	Promueve la liberación de GnRH y de gonadotropinas.	Kah et al., 1992 Trudeau, 1997 Mañanós et al., 1999.
Amh	Induce la proliferación mitótica de células germinales indiferenciadas en etapas tempranas del desarrollo gonadal y puede inhibir la proliferación y diferenciación de espermatogonias A. También puede tener un efecto inhibitorio de la esteroidogénesis y la meiosis de células germinales	Miura et al., 2002 Morinaga et al., 2007 Pfennig et al., 2015
StAr	Regula la biosíntesis de esteroides en etapas tempranas de la espermatogénesis, mediante el transporte del colesterol al sitio donde sufrirá su primera conversión enzimática (etapa limitante).	Clark et al. 1994 Stocco, 2000
Dopamina	Inhibe la síntesis y liberación de GnRH y la secreción de gonadotropinas, tanto en etapas tempranas de la gametogénesis, como tardías (maduración del oocito y ovulación en hembras, y espermiación en machos)	Aizen et al., 2005 Dufour et al., 2005 Dufour et al., 2010

Tabla 1.3. Continuación.

Aminoácido o péptido	Función reproductiva	Referencias
Tirosina	Estimula la secreción de gonadotropinas y hormona de crecimiento. Puede promover el desove en hembras y actuar en etapas tardías del proceso espermatogénico.	Peng et al., 1993 Trudeau, 1997
β-alanina	Actúa directamente a nivel de la hipófisis estimulando la secreción <i>in vivo</i> de Lh	Sloley et al., 1992
Tripsina	Actúa como un factor multifuncional en la espermatogénesis; inductor de la espermiogénesis, induce la síntesis ADN y la expresión de gen <i>spo11</i> ; un marcador de la meiosis.	Miura et al., 2009
Taurina	Promueve un aumento de las gonadotropinas en plasma, posiblemente modulando el efecto inhibitorio de la dopamina sobre la secreción de las gonadotropinas	Peter et al., 1991 Trudeau, 1997
GnIHs	Según la especie, puede estimular o reducir la liberación de Lh, Fsh y Gh. La sbGnIH2 disminuye la expresión de <i>gnrh1</i> , <i>gnrh2</i> , <i>gnrh3</i> , <i>kiss1</i> , <i>kiss2</i> y <i>kiss1r</i> en el cerebro y <i>lhβ</i> , <i>fshβ</i> , <i>gnrhr-I-IIa</i> en hipófisis. La acción de este péptido suele ser en etapas tempranas de la espermatogénesis	Biran et al., 2014 Paullada-Salmerón et al., 2016 Aliaga-Guerrero et al., 2018
Ácido glutámico	Actúa a nivel de la hipófisis, puede producir un aumento de los niveles plasmáticos de Lh y su liberación en respuesta a GnRH	Kah et al., 1993 Trudeau, 1997
Colecistoquina (CKK)	Su forma sulfatada estimula <i>in vitro</i> , en células hipofisiarias, la liberación de Lh, siendo su efecto más marcado en individuos maduros. Modula la respuesta de la hipófisis a la GnRH y la dopamina	Trudeau, 1997
Noradrenalina (NA)	Puede tener un efecto múltiple, estimulando la liberación de gonadotropinas en la hipófisis y de la GnRH en el área preóptica y en el hipotálamo	Chang et al., 1991 Yu y Peter, 1992 Trudeau, 1997
Serotonina	Actúa directamente a nivel de la hipófisis estimulando la liberación de gonadotropinas y la liberación de GnRH en el área preóptica, hipotálamo e hipófisis	Somoza y Peter, 1991 Khan y Thomas, 1992 Trudeau, 1997
Leptina	Puede estimular directamente la secreción de Lh en peces prepúberes, siendo su estimulación independiente de la secreción de Lh provocada por GnRH	Peyon et al., 2001

Tabla 1.3. Continuación.

Aminoácido o péptido	Función reproductiva	Referencias
Factores intragonadales (Tgfs, Igfs, etc.)	Los Tgfs (<i>gsdf</i> , <i>activinaβ</i>) pueden promover la proliferación de espermatogonias. Los Igfs pueden inducir la síntesis de ADN en las células espermatogoniales y se consideran como promotores de la proliferación y diferenciación de las espermatogonias. Fibrinógenos y eSRS34 promueve la renovación de espermatogonias	Sawatari et al., 2007 Sambroni et al., 2013 Yadav y Lai, 2016
11β-HSD	Esencial para la biosíntesis de andrógenos en peces	Kusakabe et al., 2003 Ozaki et al., 2006

1.3 CONTROL ENDOCRINO DE LA ESPERMATOGÉNESIS EN PECES

En el control de la espermatogénesis en peces se pueden distinguir dos tipos de mecanismos regulatorios, el intrínseco y el extrínseco (Schulz et al., 2010). El mecanismo intrínseco está determinado por el propio genoma de las células germinales (França et al., 1998), mientras que en el extrínseco intervienen las hormonas gonadotropas Lh y Fsh, los factores de crecimiento, las progestinas y las hormonas esteroideas como los andrógenos y estrógenos. Todas estas sustancias son las responsables de regular el balance y la transición entre los diferentes microambientes que son requeridos para el desarrollo del proceso espermatogénico en teleósteos (Schulz et al., 2010). Sin embargo, debido a la diversidad de especies y las distintas estrategias reproductivas presentes en el grupo de los teleósteos, no resulta fácil establecer un único patrón en relación con el modo en que actúan las hormonas implicadas en el proceso de la maduración sexual. A continuación, se resumen los principales mecanismos y factores que se han identificado como moduladores de la espermatogénesis en peces (**Fig. 1.7**).

El primer eslabón del mecanismo regulatorio extrínseco de la espermatogénesis comienza con la producción de las hormonas gonadotropas (Fsh y Lh) que, como ya se ha mencionado anteriormente, actúan directamente sobre las células de Sertoli y de Leydig, estimulando la síntesis de esteroides sexuales y de factores de crecimiento (Planas y Swason, 1995; Schulz y Miura, 2002; Yaron y Sivan, 2006; Ohta et al., 2007). Diferentes estudios muestran que la acción reguladora de ambas gonadotropinas varía según avanza el proceso

espermatogénico. La Fsh parece intervenir más en las etapas tempranas de la espermatogénesis, mientras que la Lh lo hace en las etapas tardías o durante la espermiación (Schulz et al., 2010). De hecho, se ha demostrado *in vitro* que la Fsh promueve la proliferación espermatogonial, incluso hasta la espermiogénesis (Loir, 1999; Ohta et al., 2007), promoviendo también la proliferación de las células de Sertoli durante la recrudescencia temprana (Schulz et al., 2005). Asimismo, en el salmón real “Chinook” (*Oncorhynchus tshawytscha*) los niveles de Fsh aumentan tanto en hipófisis como en plasma durante la proliferación temprana de las espermatogonias, mientras que los niveles plasmáticos de Lh incrementan sólo durante la espermiación (Campbell et al., 2003). En el caso de la lubina europea, el desarrollo de técnicas inmunológicas y bioensayos para el análisis de la Fsh en esta especie (Molés et al., 2011a, 2012) ha demostrado en experimentos efectuados en cultivo de testículos *in vitro*, que mientras la Lh estimula de forma más potente la producción de 11-KT que la Fsh (Molés et al., 2011b), la administración de Fsh recombinante promueve la proliferación espermatogonial y su diferenciación en espermatocitos (Mazón et al., 2014). Además, la Lh es capaz de activar la espermiación y provocar un incremento del volumen de esperma en esta especie (Mazón et al., 2015). Por otra parte, los estudios sobre la expresión molecular de las subunidades β de ambas hormonas en teleósteos han permitido dilucidar en qué momento de la espermatogénesis estas hormonas ejercen su acción. No obstante, es importante señalar que los niveles de expresión de dichos genes no necesariamente reflejan los niveles de estas hormonas en plasma (Mateos et al., 2002; Levavi-Sivan et al., 2010). Por ejemplo, en especies como el esturión ruso (*Acipenser gueldenstaedtii*), el congrio japonés (*Conger myriaster*), la tilapia (Levavi-Sivan et al., 2010) y el salmón (Gomez et al., 1999; Vischer y Bogerd, 2003) se han encontrado niveles de expresión altos del gen *fsh β* en etapas tempranas de la espermatogénesis, mientras que en etapas tardías, la expresión de *fsh β* disminuye, aumentando la expresión de *lh β* y del contenido de Lh en la hipófisis, pero no así de los niveles circulantes de Lh (Gómez et al., 1999; Hassin et al., 1999, 2000). Estos resultados sugieren que la secreción de Lh en teleósteos es un proceso altamente regulado, es decir, el mecanismo de control de la síntesis, difiere al de secreción, no existiendo una correspondencia entre el contenido de esta hormona en hipófisis con los niveles circulantes (Swanson et al., 2003; Molés et al., 2007). En el caso de la lubina europea se ha demostrado que los niveles de expresión de *fsh β* son elevados desde el periodo de diferenciación gonadal hasta el denominado desarrollo gonadal tentativo (TGD).

En cambio, la expresión de *lhβ* refleja unos niveles mínimos durante la diferenciación sexual y aumenta hasta alcanzar el periodo TGD. De hecho, los niveles plasmáticos de Lh más altos se registran durante la espermiación (Molés et al., 2007). Todas estas evidencias indican que el papel de las gonadotropinas en la espermatogénesis de la lubina es similar al descrito en mamíferos y salmones, es decir, mientras que la Fsh participa más activamente en las etapas tempranas del desarrollo gonadal, la Lh lo hace en etapas más tardías de la espermiación (Mazón et al., 2015). Cabe mencionar que si bien es cierto que las hormonas gonadotropas son los factores iniciales que modulan el proceso de la espermatogénesis en peces, también otras hormonas secretadas en la hipófisis, como la hormona de crecimiento (Gh), pueden modular directa o indirectamente la esteroidogénesis (Singh et al., 1988; Le-Gac et al., 1996) y/o la proliferación de células germinales y de Sertoli (Loir, 1999; Schulz et al., 2010). De hecho, se han encontrado receptores de Gh en los testículos de trucha y en poblaciones enriquecidas de células de Sertoli (Le-Gac et al., 1993).

El segundo eslabón del control endocrino de la espermatogénesis lo constituyen los esteroides sexuales, cuya producción tiene lugar en respuesta a los niveles circulantes de las hormonas gonadotropas. Éstos actúan indirectamente sobre la proliferación espermatogonial, induciendo o inhibiendo la expresión, en las células de Sertoli, de factores de crecimiento entre otras sustancias (Chen et al., 2013; Sambroni et al., 2013). Como ya se ha mencionado, previamente a la proliferación y diferenciación espermatogonial, existe un proceso de renovación de las células germinales (Miura y Miura, 2003), donde las progestinas (Chauvigné et al., 2017) y principalmente los estrógenos juegan un papel fundamental (Miura et al., 1999; Song y Gutzeit, 2003). Prueba de ello es que, el 17β -estradiol promueve la renovación de las espermatogonias primarias en la anguila japonesa (Miura et al., 1999) y el salmón hucho (*Hucho perryi*) (Amer et al., 2001), pero no la proliferación de aquellas células germinales que posteriormente entra en meiosis (Miura et al., 2003). Por el contrario, durante el inicio de la proliferación y diferenciación de las espermatogonias, son principalmente los andrógenos los que juegan un papel clave en la consecución del proceso espermatogénico. De hecho, en la anguila japonesa se ha encontrado que durante la recrudescencia temprana hay un aumento significativo de la síntesis y liberación de 11-KT (Ohta et al., 2007), hormona que se considera clave para el inicio de la proliferación de las espermatogonias (Miura et al. 1991ab, 1996;

Miura y Miura, 2001, 2003). A este respecto se ha demostrado *in vitro* que la 11-KT es capaz de inducir todos los estados del proceso espermatogénico en la anguila japonesa (Miura et al., 1991ab). Sin embargo, también las progestinas pueden estimular la proliferación y diferenciación de generaciones tempranas de espermatogonias como se ha demostrado en el pez cebra (Chen et al., 2013). En etapas tardías de la gametogénesis, el papel de los andrógenos no parece ser tan importante, y si bien durante esta fase pueden existir niveles circulantes de 11-KT, al menos, en la anguila, no parece participar en el proceso meiótico (Miura et al., 1995). Por el contrario, durante la recrudescencia tardía y/o la espermiación, las progestinas y los estrógenos parecen ejercer un papel clave. En el caso de las progestinas se considera que éstas son necesarias para el reclutamiento de espermatogonias, la meiosis (Miura et al., 2006; Chen et al., 2013; Liu et al., 2014) y la estimulación del proceso de espermiación (Scott et al., 2010; Bryan et al., 2015; Shahi et al., 2015). Por ejemplo, se ha demostrado que existe una correlación entre los niveles de Lh circulantes con un incremento de DHP, coincidiendo con la aparición de células germinales post-meióticas y del receptor de la Lh en los testículos (Prat et al., 1996; Gómez et al., 1999; Campbell et al., 2003). Asimismo, la DHP incrementa la producción de esperma (Baynes y Scott, 1985; Yueh y Chang, 1997) y la movilidad de los espermatozoides en el salmón japonés (*Oncorhynchus masou*) y en la corvina (*Micropogonias undulatus*) (Tubbs y Thomas, 2008). Por otro lado, estudios efectuados en la trucha arcoíris, el timalo (*Thymallus thymallus*) (Lahnsteiner et al., 2006) y la dorada (Chaves-Pozo et al., 2007), han demostrado que los estrógenos, en particular el E₂, pueden acelerar eventos tardíos del proceso espermatogénico, inhibir la proliferación de las células germinales, provocar la apoptosis de células espermatogoniales no diferenciadas, inducir la infiltración de granulocitos acidofílicos, reducir el volumen del fluido seminal, aumentar la densidad del esperma y generar la esterilidad en peces.

El tercer y último eslabón del control espermatogénico está representado por todas aquellas sustancias que son reguladas por los esteroides sexuales, entre las cuales están varios genes, algunos de ellos importantes en el desarrollo gonadal (Schulz et al., 2010; Blázquez et al., 2017). Así, el efecto que tiene el E₂ sobre la renovación espermatogonial está asociado a que esta hormona estimula la expresión de varios genes en las células de Sertoli, cuyos productos participan en dicha renovación. Uno de estos productos es el eSRS34, una sustancia homóloga al factor de crecimiento endotelial celular de humanos (PD-ECGF)

(Miyazono et al., 1987). La forma recombinante de eSRS34 es capaz de inducir en la anguila japonesa la renovación de las espermatogonias madre, pero no la proliferación de éstas para su posterior diferenciación y producción de espermatozoides (Miura et al., 2003). En la dorada, se ha demostrado *in vitro* que el E₂ es capaz de incrementar significativamente la expresión del receptor de progestina *pgr* en las células de Sertoli. Dado que el *pgr* actúa como un factor de transcripción, su expresión se ha correlacionado con un aumento de la renovación de células germinales (Chauvigné et al., 2017) y con la aparición de espermatogonias B tardías en el salmón (Chen et al., 2011). Por otro lado, aunque la localización de los receptores de estrógenos varía según la especie (Ito et al., 2007; Rocha et al., 2009; Chauvigné et al., 2014; Massart et al., 2014), se sugiere que éstos pueden mediar la regulación del *pgr* en las células somáticas y la proliferación de las espermatogonias (Chauvigné et al., 2017). Por otro lado, en la dorada, la progestina 17,20βP también promueve la expresión de *pgr* en las células de Sertoli y Leydig, durante la renovación espermatogonial, razón por la cual se sugiere que esta hormona junto con el E₂, podrían estar modulando dicho proceso (Chauvigné et al., 2017). En el caso de la proliferación rápida y diferenciación de las células germinales, se considera que la 11-KT juega un papel primordial (Rolland et al., 2013). De hecho, este andrógeno aumenta la producción de Igf1 y activina β (**Tabla 3**) en las células de Sertoli (Loir y Le Gac, 1994; Le Gac et al., 1996) y disminuye la expresión de la *amh*. La hormona anti-mülleriana (**Tabla 4**) se considera como un inhibidor de la progresión de la espermatogénesis (Blázquez et al., 2017), mientras que el Igf1 y la activina β actúan promoviendo la proliferación de espermatogonias tipo B sin iniciar la meiosis (Miura et al., 1995; Miura y Miura, 2003). La 11-KT también estimula la expresión del *pgr* en las células de Leydig, razón por la cual este gen también podría estar induciendo la entrada en meiosis de las espermatogonias (Chauvigné et al., 2017). En el caso de las progestinas y su efecto sobre la proliferación espermatogonial, en el pez cebra se ha demostrado que estimulan en las células de Sertoli la expresión de genes tales como *igf3*, *amh* y *gsdf* (Chen et al., 2013). Sin embargo, en etapas intermedias o tardías del proceso espermatogénico los andrógenos inhiben la expresión de *igf3*, lo cual podría disminuir la proliferación de espermatogonias y por ende reducir su número a nivel testicular como ocurre en la trucha arcoíris (Sambroni et al., 2013). Un efecto similar se ha demostrado tanto en tilapia (Berishvili et al., 2010) como en el pez cebra (Nelson y Van Der Kraak, 2010), donde los estrógenos y la DHP, reducen la expresión del *igf3*. En el pez cebra, el *igf3* estimula de forma autocrina

la proliferación de las células de Sertoli (Morais et al., 2013) y de forma paracrina la proliferación de espermatogonias A y B y la entrada de éstas últimas en meiosis (Nóbrega et al., 2015). No obstante, en etapas tardías del proceso espermatogénico, el *igf3* parece participar de forma independiente en la seriola de aleta amarilla (*Seriola quinqueradiata*), donde quizás está regulando vía autocrina/paracrina la funcionalidad del esperma (Higuchi et al., 2017) como ocurre en mamíferos (Henricks et al., 1998). Durante esta fase, las progestinas también son capaces de activar la enzima anhidrasa carbónica denominada eSRS22 que es responsable del aumento del nivel de cAMP del esperma y del incremento del pH del plasma seminal, una condición indispensable para la viabilidad de los espermatozoides (Miura y Miura, 2003).

Es importante señalar que hasta el momento se ha descrito el efecto de los esteroides sexuales como segundas sustancias que median entre las hormonas gonadotropas y aquéllas que afectan directa o indirectamente la proliferación y diferenciación de las células germinales. Sin embargo, en teleósteos existe un efecto directo de las hormonas hipofisarias sobre el proceso espermatogénico que se ha estudiado muy poco (Sambroni et al., 2013). Algunos estudios demuestran que la Fsh, Lh y la Gh, pueden actuar sobre la expresión de genes, tanto en las células de Sertoli como en otros tejidos diana, independientemente de la ruta esteroidogénica. Por ejemplo, en etapas tempranas de la espermatogénesis en la anguila japonesa, se ha confirmado que la Gh promueve la liberación en el hígado de Igf1 (Campbell et al., 2003), lo que parece favorecer la acción estimuladora de los andrógenos y por ende la proliferación de células germinales (Miura y Miura, 2001). También la Gh puede tener un efecto estimulador de la proliferación de espermatogonias, independientemente a la producción de hormonas esteroideas e Igf1, como ha sido demostrado *in vitro* en la anguila japonesa (Miura et al., 2011). Por otro lado, en el pez cebra se ha evidenciado que la Fsh promueve en las células de Sertoli la producción de Igf3 (Nóbrega et al., 2015). Además, otros estudios realizados en trucha (Sambroni et al., 2013) y pez cebra han demostrado que la Fsh induce la expresión de ciertos genes de forma independiente a los esteroides sexuales, tanto en las células de Sertoli como de Leydig, además, dependiendo de la etapa del desarrollo gonadal, puede existir un efecto de cooperación o antagónico entre esta hormona y los esteroides sexuales (Sambroni et al., 2013).

En este último eslabón del control espermatogénico, los mecanismos de retroalimentación de los esteroides sexuales juegan un papel fundamental, ya que regulan no sólo la producción de los propios esteroides sexuales, sino también, la producción de neuropéptidos y neurotransmisores a nivel del cerebro y de la hipófisis, quedando afectada toda la cascada endocrina en el eje reproductor (Ozaki, et al., 2006; Zohar et al., 2010). En la lubina se ha demostrado que la testosterona y el estradiol disminuyen la expresión y la liberación, tanto *in vivo* como *in vitro* de la Fsh (Mateos et al., 2002; Espigares et al., 2015c). De hecho, se ha encontrado que el E₂ disminuye la expresión del receptor nuclear *esrb2* en las células productoras de Fsh y Lh, lo que sugiere un posible control de este receptor sobre la síntesis de gonadotropinas (Muriach et al., 2008ab). Por otro lado, en la anguila japonesa se ha demostrado que la 11-KT promueve la liberación de DHP y ésta a su vez estimula la producción de 11-KT en etapas tardías de la espermatogénesis (Miura et al., 2006). Se ha sugerido que esta retroalimentación positiva se hace a través de DHP sobre la expresión del gen de la 11-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (*11β-hsd*). Esta enzima cataliza el paso final de la producción de 11-KT en peces y por ende promueve así la progresión del proceso espermatogénico hasta la producción de esperma (Ozaki, et al., 2006). En general, los distintos estudios efectuados en teleósteos han confirmado que los andrógenos producen un efecto de retroalimentación negativa sobre la producción de Fsh y Lh, específicamente de la expresión de *lhβ* y/o *fshβ*, mientras que los estrógenos provocan el efecto contrario (Wylie et al., 2018). Los factores de crecimiento también pueden tener un efecto de retroalimentación sobre las hormonas gonadotropas como ocurre en la anguila japonesa, donde estimulan la expresión de *lhβ* y *fshβ* (Aroua et al., 2008). No obstante, en peces no existe un único patrón en cuanto al control de la espermatogénesis y puede ser diferente según la especie, el estado de maduración gonadal y otros factores (Zohar et al., 2010).

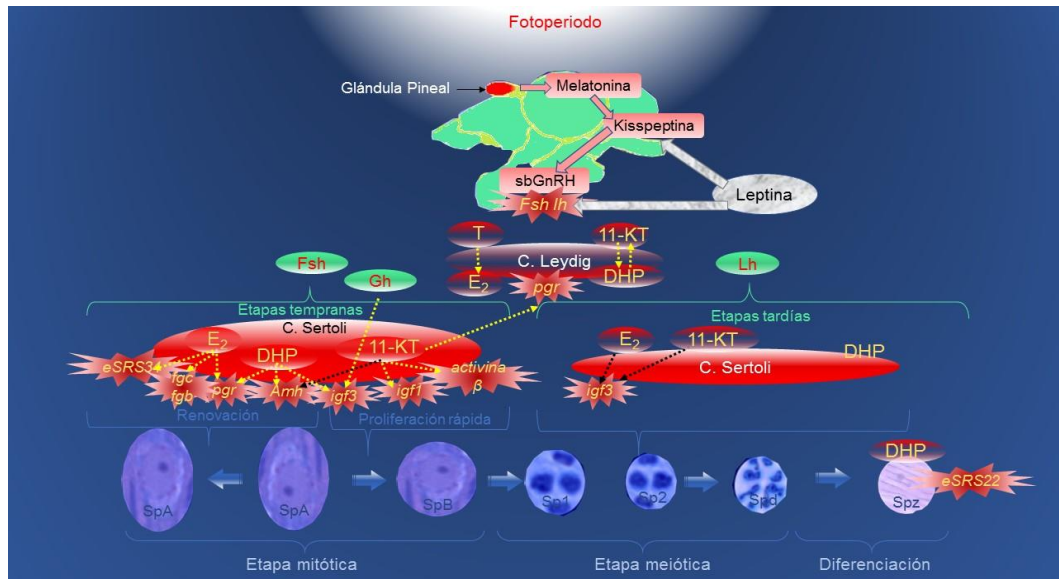


Figura 1.7. Resumen de las principales rutas y factores endocrinos que afectan el proceso espermatogénico en peces. Pueden existir diferencias en cuanto al patrón mostrado y no necesariamente estar demostrado en todas las especies estudiadas. Las líneas punteadas amarillas y/o negras indican un efecto estimulador o inhibitorio sobre la expresión de los genes, respectivamente. SpA: espermatogonia tipo A, SpB: espermatogonia tipo B, Sp1: espermatocito primario, Sp2: espermatocito secundario, Spd: espermátida, Spz: espermatozoides (Tomado de Schulz et al., 2010; Yang et al., 2010; Zohar et al., 2010; Pasquier et al., 2011; Morais et al., 2013; Espigares et al., 2015c; Nobrega et al., 2015; Ohga et al., 2018; Tovo-Neto et al., 2018)

1.4 MADURACIÓN PRECOZ O PUBERTAD PREMATURA

La cría de peces bajo condiciones de cultivo intensivo favorece a que el proceso de pubertad ocurra antes del tiempo esperado, lo que se conoce como maduración precoz o pubertad prematura. La maduración precoz suele manifestarse tanto en machos como en hembras de especies que tienen un interés acuícola (**Tabla 1.4**) tales como la tilapia (Longalong et al., 1999), el salmón del atlántico (McClure et al., 2007), la perca (Shewmom et al., 2007), la dorada (Ginés et al., 2003), el bacalao (Karlsen et al., 2006), el fletán (*Hippoglossus hippoglossus*) (Longalong et al., 1999), la trucha alpina (*Salvelinus alpinus*) (Liu y Duston, 2018), la cachama negra (*Colossoma macropomum*) (Almeida et al., 2016) y la lubina europea (Carrillo et al., 1995, 2009a; Begtashi et al., 2004; Felip et al., 2008). Desde un punto de vista productivo, cuando la maduración sexual se manifiesta antes de que el pez alcance su talla comercial, esta situación acarrea pérdidas económicas al sector. Principalmente, la disminución de la rentabilidad de las empresas acuícolas se ve afectada debido a que los animales precoces disminuyen su tasa de crecimiento y no logran alcanzar el tamaño comercial en el

momento de su cosecha (comercialización) y, consecuentemente, tienen que ser mantenidos por mucho más tiempo en las instalaciones hasta alcanzar la talla deseada (Carrillo et al., 2015). En este sentido, un descenso de la tasa de crecimiento provoca una disminución de la eficiencia de conversión alimenticia (Stead et al., 1999) y de la eficacia de alimentación lo que se traduce en un mayor coste de alimentación. También una tasa de crecimiento menor ralentiza la rotación de los lotes en los viveros según la talla de pez que, junto al tamaño de los cultivos, determinan la rentabilidad de la cría de peces (Ruesga, 2005). Es importante señalar que, en general, a mayor volumen o cantidad de peces criados los cultivos suelen ser más rentables, debido a un abaratamiento de los costes de producción lo que en términos económicos se conoce como economía de escala, siendo los costes de alimentación el mayor gasto al que se enfrentan las empresas destinadas a la cría y engorde de peces (De Benito et al., 2012). Por otro lado, desde un punto de vista fisiológico, la disminución de la tasa de crecimiento de los peces durante su pubertad, se debe principalmente a que durante el desarrollo sexual, la mayoría de los nutrientes obtenidos en la dieta y por ende la energía que adquiere el animal, se redirige hacia el proceso de la gametogénesis y conductas relacionadas con la reproducción como son la migración y/o conductas agonistas previas y durante la época de puesta (Healey et al., 2003; Johnson y Johnson, 2003; Hendry y Beall, 2004; Carrillo et al., 2009ab; Taranger et al., 2010). Este último aspecto es muy importante, y se ha llegado a considerar que la magnitud del descenso y/o la pérdida de peso corporal durante el proceso de maduración sexual en el animal, depende del esfuerzo reproductivo en términos de conducta reproductiva y producción de gametos (Hendry y Beall, 2004). No obstante, el descenso de la tasa de crecimiento en los animales puede ser debido también a que los peces experimentan una disminución de su apetito durante la temporada de puesta (Kadri et al., 1996; Tveiten et al., 1996; Fordham y Trippel, 1999; Skjaeraasen et al., 2004). Además, los cambios fisiológicos y conductuales que se producen durante la maduración sexual pueden también provocar desórdenes fisiológicos y hacer a los peces más vulnerables a las enfermedades (Skarstein et al., 2001; Cuesta et al., 2007). Asimismo, puede haber un aumento de la agresividad (Fleming, 1996) lo que trae como consecuencia daños corporales que hacen a los peces susceptibles a infecciones secundarias e infecciones por parásitos (Skarstein et al., 2001), o incluso pueden aparecer ciertas alteraciones en la homeostasis fisiológica de los individuos como es el caso de los salmones que presentan una capacidad hipo-osmoregulatoria (Makino et

al., 2007). Todas estas alteraciones son provocadas, en parte, por el efecto inmuno-modulador producido por los cambios en los niveles de los esteroides sexuales, el cortisol y las hormonas de crecimiento (Yada y Nakanishi, 2002; McQuillan et al., 2003), existiendo así una relación directa entre alguna de estas alteraciones y el aumento de la mortalidad en los sistemas de cultivo (Makino et al., 2007). Sumado a estos factores, la entrada en pubertad puede también ocasionar la aparición de caracteres morfológicos secundarios tales como la deformación de la mandíbula o cambios en el color de la piel como ocurre en el salmón del Atlántico (Aksnes et al., 1986) que, junto a una disminución en las propiedades organolépticas de su carne, hacen que los peces precoces sean más difíciles de comercializar (Carrillo et al., 1995; Taranger et al., 2010; Carrillo et al., 2015).

Tabla 1.4. Resumen de algunas especies de interés acuícola que tienen pubertad prematura en condiciones de cultivo intensivo. Los parámetros tomados como indicativos de precocidad pueden ser diferentes según cada estudio, y no necesariamente reflejan la culminación del proceso gametogénico. Los símbolos ♂, ♀ representan individuos machos y hembras, respectivamente. Los valores entre corchetes [] indican el primer momento en el cual se observan los primeros individuos precoces. { } Indica la edad de la maduración sexual en condiciones naturales (no en todos los estudios viene indicado la edad de la maduración precoz ni la proporción de individuos prematuros para cada sexo).

Espece	Maduración precoz (%)
Salmón del atlántico (<i>Salmon salar</i>)	47%♂-9%♀ (Harmon et al., 2003)
Tilapia <i>Oreochromis niloticus</i>)	83%♀ (Longalong et al., 1999)
Perca amarilla (<i>Perca flavescens</i>)	15%♂-51%♀ [120 días] (Shewmon et al., 2007)
Bacalao (<i>Gadus morhua</i> L.)	98%♂ [2 años] {4-6, 6-8 años ♂♀} (Karlsen et al., 2006; Davie et al., 2007b)
Halibut-Fletán (<i>Hippoglossus hipoglossus</i>)	100%♂ [2 años] {4,5 años ♂-7,8 años ♀} (Jakupsstovu y Haug, 1988; Norberg et al., 2001).
Dorada (<i>Sparus aurata</i> L.)	95%♂♂ [1 año] {hermafrodita 2 año ♂-3 año ♀} (Kissil et al., 2001)
Lubina Europea (<i>Dicentrarchus labrax</i> L.)	22%♂ [1 año] {2 año ♂-3 año ♀} (Carrillo et al., 1995; Begtashi et al., 2004)
Chinook Salmon (<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>)	90%♂-25%♀ [2 año] (Unwin et al., 2005)
Trucha alpine (<i>Salvelinus alpinus</i>)	65%♂-88%♀ [2 años] (Liu y Duston, 2018)
Cachama negra (<i>Colossoma macropomum</i>)	100%♂ [5 meses ♂] {4-5 años ♂ ♀} (Almeida et al., 2016; Morais y O'sullivan, 2017)

Los inconvenientes que representan la pubertad prematura para las empresas acuícolas plantean la necesidad de desarrollar estrategias encaminadas a mitigar o disminuir su aparición en condiciones de cultivo. Para ello, es imprescindible entender cuáles son los factores que la inician y/o modulan. Si bien, a medida que avanzan las investigaciones se descubren nuevos actores que participan en el proceso de maduración sexual, hasta el momento, no está claro del todo cómo comienza ni qué la desencadena. Se sabe que la pubertad prematura, al igual que ocurre con el proceso de la pubertad, se inicia con la activación del eje cerebro-hipófisis-gónada, donde señales internas y ambientales modulan dicho proceso (Carrillo et al., 2015).

En climas templados, se considera que la señal ambiental más importante capaz de afectar el proceso reproductor de los peces es el fotoperiodo (Migaud et al., 2010). De hecho, se ha sugerido que las especies que viven en dichas latitudes perciben el cambio fotoperiódico durante el solsticio de verano. Dicho cambio, actúa como la señal que dispara el comienzo de la maduración sexual (Bromage et al., 2001). Sin embargo, no está del todo claro cómo esta señal lumínica es descodificada (“transducida”) y afecta al eje reproductor (Cowan et al., 2017). Existen evidencias que demuestran que el fotoperiodo afecta a los niveles de melatonina que, se sugiere, puede actuar como una hormona fotoperiódica mensajera (Bayarri et al., 2010). De hecho, en la lubina europea se ha demostrado que la melatonina puede alterar los niveles de expresión de las kisspeptinas (Alvarado et al., 2015), un neuropéptido clave en la cascada endocrina de la reproducción y que está implicado en la activación de la pubertad (Carrillo et al., 2015). Por otro lado, también la condición energética del pez o el tamaño, puede ser un factor determinante a la hora de que se active o no la maduración sexual (Begtashi et al., 2004; Taranger et al., 2010; Liu y Duston, 2016; Espigares et al., 2017). En virtud de ello, se ha sugerido que el pez tiene que alcanzar una talla crítica o alcanzar un umbral energético suficiente para poder iniciar y culminar con éxito su maduración sexual (Rowe et al., 1991; Bromage et al., 2001). Distintos estudios han revelado que en peces de la misma edad, pero con tallas diferentes, los de mayor tamaño son más proclives a manifestar una pubertad anticipada (Begtashi et al., 2004; McClure et al., 2007; Felip et al., 2008; Espigares et al., 2017). No obstante, el mecanismo por medio del cual se integra las señales endocrinas con la condición energética del pez y se inicia la maduración sexual, sigue siendo una incógnita. A este respecto, en mamíferos, hay evidencias que

proponen que la hormona leptina está involucrada en dicha integración y juega un papel esencial en la regulación de la pubertad (Sánchez-Garrido y Tena-Sempere, 2013). En efecto, se considera que puede actuar como un factor permisivo de la pubertad (Avendaño et al., 2017) como parece también actuar en peces, al menos así se ha descrito en la lubina europea (Escobar et al., 2016). En el salmón del Atlántico, estudios recientes han demostrado una correlación entre la expresión de leptina y el avance del proceso espermatogénico (Trombley y Schmitz, 2013; Trombley et al., 2014). También, en el estornino (*Scomber japonicus*), la expresión de esta hormona se correlaciona con la expresión de algunos genes claves para el proceso reproductivo como el gen *kiss1* en el cerebro y la *lhβ* en hipófisis. Sin embargo, la función específica de la leptina en el proceso reproductivo en teleósteos se desconoce todavía (Ohga et al., 2017). En todo caso, diversos estudios apoyan la idea de que la condición energética del animal puede determinar los umbrales mínimos de las principales hormonas implicadas en el proceso de maduración sexual y que son necesarios para que el pez pueda iniciar su pubertad, incluso de manera temprana (Carrillo et al., 2015). Para profundizar en este hecho, la presente tesis evaluará esta situación (**capítulo 4, artículo 1**).

1.4.1 Pubertad prematura de la lubina

En la lubina, y bajo condiciones de cría intensiva, cerca de un 20-30% de los individuos machos maduran precozmente durante su primer año de vida antes de alcanzar su talla comercial que suele coincidir con su segundo año de vida. Sumado a esto, generalmente en las plantas acuícolas la proporción de machos y hembras en esta especie suele ser de 3:1, respectivamente, lo que se traduce en una proporción significativa de individuos precoces (Carrillo et al., 1995). Esta condición, como ya se ha mencionado anteriormente, puede generar grandes pérdidas económicas. En el caso de la lubina éstas se deben principalmente a que los individuos precoces tienen que ser mantenidos por mucho más tiempo hasta que alcanzan el peso ración para su venta (350-400 g). Se ha demostrado que si bien durante el primer año de vida los machos precoces de lubina registran un tamaño superior al de los individuos no precoces, en el segundo año su tasa de crecimiento es menor, alcanzando un 18% menos en peso y un 5% menos en talla que la de los individuos no precoces (Felip et al., 2006). Por otro lado, hay también indicios que las hembras de lubina pueden también madurar precozmente durante su segundo año de vida (Brown et al., 2014), aunque las consecuencias de esta

situación no se han evaluado todavía. En este sentido, la repercusión que estas circunstancias pueden tener para el sector necesitan tenerse en cuenta dado que en los últimos años ha aumentado la tendencia a comercializarse ejemplares de tallas superiores (Ruesga, 2005).

1.5 CONTROL FOTOPERIÓDICO DE LA PUBERTAD PREMATURA DE LA LUBINA

Las variables ambientales que afectan el proceso reproductivo se pueden clasificar en dos tipos; factores próximos, esto es las variables ambientales como el fotoperiodo, que determinan los ritmos biológicos anuales de los peces, y los factores últimos, es decir las variables ambientales como la temperatura y la disponibilidad de alimento, que restringen la actividad reproductora a un tiempo determinado del año (Thomson, 1950). Como ya se ha mencionado antes, para los peces que habitan en climas templados, el fotoperiodo es la variable ambiental más importante capaz de afectar su proceso reproductivo (Carrillo et al., 2015). En efecto, mediante la manipulación del fotoperiodo es posible cambiar la tasa de maduración sexual y la época de puesta de muchas especies de interés acuícola, entre ellas la lubina europea (Carrillo et al., 1995; Zanuy et al., 1995). En este sentido, poder anular o enmascarar el cambio fotoperiódico que se produce durante el solsticio de verano por medio de la administración de luz continua (LL), es decir, regímenes de 24 horas de luz constante todo el día, previene el inicio de la pubertad temprana en los peces que habitan dichas latitudes (Davie et al., 2007b). Distintos estudios efectuados en salmónidos (Taranger et al., 1989), bacalao (Davie et al., 2007b), lenguado (Imslund et al., 2003; García-López et al., 2006) y lubina europea (Begtashi et al., 2004; Migaud et al., 2004; Rodríguez et al., 2005; Felip et al., 2008; Carrillo et al., 2009b) han evaluado la efectividad que la luz continua tiene para reducir de manera significativa la maduración precoz en peces.

En el caso particular de la pubertad prematura de la lubina europea, un primer estudio efectuado por Begtashi et al. (2004), demostró que la aplicación de un régimen de luz continua en lotes mayoritariamente de machos durante todo el primer año de vida provocaba una disminución significativa en el porcentaje de peces precoces en la población (<3%) (**Fig. 1.8A**). Sin embargo, se observó que

los peces sometidos a estas condiciones experimentales eran más susceptibles de padecer enfermedades, lo cual, desde un punto de vista productivo, podría generar pérdidas en los sistemas de cultivo. Además, si bien este tipo de tratamiento prolongado con LL resulta eficaz para reducir la maduración precoz en esta especie, se sabe que no siempre es rentable ni de fácil aplicación, entre otras razones, porque algunas piscifactorías se encuentran en mar abierto o en zonas alejadas de la costa donde no resulta fácil su implementación (Carrillo et al., 2009b). Por tanto, fue necesario encontrar un periodo a lo largo del desarrollo del animal en el que la administración del tratamiento con LL fuera mucho más corto en el tiempo (duración) pero igual de eficaz para disminuir la precocidad y además tuviera un menor impacto en el bienestar de los peces. Con este propósito, Felip et al. (2008) realizó un estudio en el que aplicó regímenes de luz continua durante 4 y 6 meses, coincidiendo con la época de pregametogénesis (de junio a septiembre) y gametogénesis (de octubre a marzo), respectivamente, en la lubina (**Fig. 1.8B**). Este estudio demostró que ambos tratamientos son efectivos y disminuyen la precocidad a valores similares a los documentados por Begtashi et al. (2004). Además, estos resultados permitieron sugerir que podría existir un periodo fotosensible aún más corto, ubicado entre los meses de agosto y noviembre, en el cual, aplicando LL, se podría reducir significativamente la pubertad prematura en esta especie. Esta hipótesis es precisamente uno de los objetivos propuestos en el presente estudio (**capítulo 4, artículo 1**).

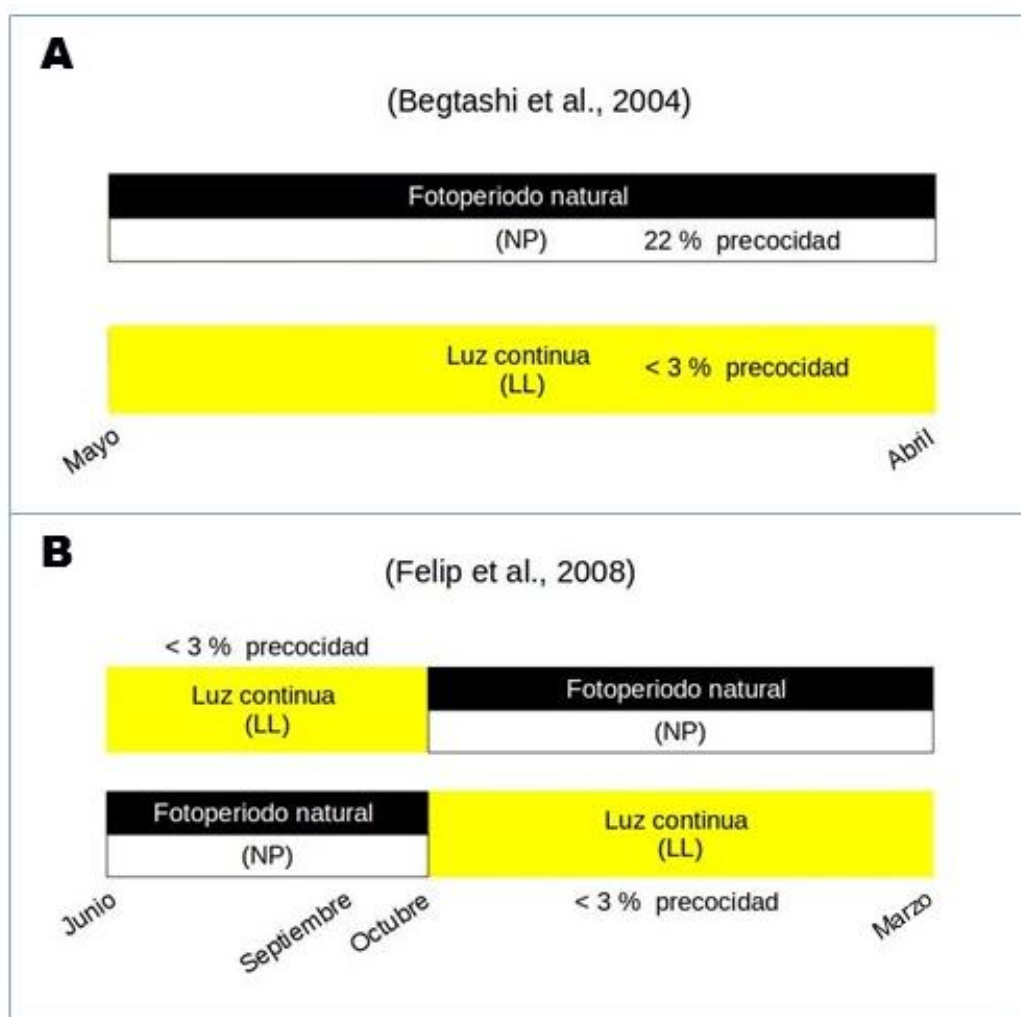


Figura 1.8. Regímenes de luz continua (LL) aplicados durante el primer año de vida en machos de lubina y que reducen significativamente la maduración precoz. A) Estudio efectuado por Begtashi et al. (2004). B) Estudio efectuado por Felip et al. (2008). NP: fotoperiodo natural, LL: luz continua.

Es importante señalar que si bien los estudios llevados a cabo por Begtashi et al. (2004) y Felip et al. (2008) lograron disminuir significativamente la pubertad prematura de la lubina durante su primer año de vida, se desconocía el efecto que este tipo de tratamiento tenía sobre los parámetros de crecimiento y reproductivos de esta especie durante su segundo año de vida, cuando los animales alcanzan su talla comercial y normalmente entran en pubertad. Esta información resultaría valiosa para las empresas acuícolas que crían esta especie y que pretendan aplicar dichas estrategias fotoperiódicas. Por esta razón en la presente tesis, un segundo objetivo de estudio fue evaluar el uso de la LL durante el segundo de año de vida y de cultivo de los animales para estimar la maduración de los animales

(capítulo 5, artículo 2). Por otro lado, si bien en la lubina se ha analizado el efecto de aplicar regímenes fotoperiódicos largos y cortos sobre la maduración sexual, el crecimiento y las principales hormonas que actúan en el eje endocrino cerebro-hipófisis-gónada (Zanuy et al., 1986, 1995; Rodríguez et al., 2001ab; Halm et al., 2004; Carrillo et al., 2010), los efectos de la LL sobre la pubertad prematura de esta especie son más escasos (Begtashi et al., 2004; Rodríguez et al., 2005; Felip et al., 2008). Además, en los últimos años se han identificado nuevos factores y/o mecanismos, a nivel molecular, que pueden estar regulando el proceso reproductor en teleósteos y su estudio bajo estas condiciones experimentales pueden ayudarnos a entender mejor el control de la reproducción en peces. Entre estos factores está la hormona anti-Mülleriana (**Tabla 1.3**), que en mamíferos es conocida por su función durante la regresión de los ductos Müllerianos durante la embriogénesis de los individuos machos, y que también inhibe la entrada en meiosis de las células germinales tanto en hembras como en machos, así como la esteroidogénesis y el desarrollo de células de Leydig (Behringer et al., 1990; Lee y Donahoe, 1993; Racine et al., 1998; Josso y di Clemente, 2003; Rey et al., 2003). Aunque los peces no tienen ductos Müllerianos, se han encontrado diferentes ortólogos del gen *amh*. De hecho, diferentes estudios han demostrado que la Amh puede tener un papel relevante en el desarrollo gonadal y la esteroidogénesis en teleósteos. La Amh parece inhibir la proliferación y diferenciación de las células espermatogoniales, así como la síntesis de andrógenos en las células de Leydig y disminuir la expresión de enzimas claves de la ruta esteroidogénica como la *stAR* (**Tabla 1.3**) (Miura et al., 2002; Skaar et al., 2011). Por lo tanto, la Amh puede ser un factor de crecimiento clave en el inicio de la pubertad en peces y por tanto en el proceso de maduración precoz de la lubina que merece ser evaluado. Además, algunos estudios sugieren que los andrógenos pueden inhibir la expresión de *amh*, particularmente la 11-KT (Miura et al., 2002) que se considera una hormona clave en la activación de la pubertad en la lubina (Rodríguez., et al, 2005). De hecho, un estudio realizado por Carrillo et al. (2009b) demostró que la 11-KT no sólo modula la espermatogénesis y estimula la espermiación en machos prepúberes de lubina expuestos a regímenes de LL, sino que además es capaz de estimular la expresión de las gonadotrofinas y aumentar los niveles de Lh en plasma. De acuerdo con estas observaciones, los niveles circulantes de esta hormona se han considerado como un tipo de marcador no invasivo del estado testicular de los animales, y por tanto de su maduración (precocidad) para evaluar la efectividad de los distintos regímenes de LL aplicados

en el presente estudio en la lubina (**capítulo 5, artículo 2**). Por otro lado, otros de los factores que parecen ser relevantes en el desarrollo gonadal en peces son los receptores de estrógenos, los cuales pueden actuar como factores de transcripción (Mangelsdorf et al., 1995) y mediadores del efecto que tiene el estradiol en la renovación espermatogonial (Miura y Miura, 2011). Su identificación y caracterización molecular en la lubina (Halm et al., 2004; Muriach et al., 2008ab) ha permitido evaluar su expresión en distintos tejidos y etapas de desarrollo en esta especie. Se han encontrado niveles altos de expresión de *erβ1* y *erβ2* en testículos de lubina a finales del periodo de la diferenciación sexual (Halm et al., 2004; Blázquez et al., 2008), coincidiendo con la época durante la cual los individuos precoces inician su proceso espermatogénico (Rodríguez et al., 2001ab; Papadaki et al., 2005). Estas evidencias sugieren que los receptores de estrógenos pueden tener una función muy importante en la acción esteroideogénica durante la pubertad y por ende ser claves en el proceso de maduración precoz de la lubina. Lo mismo ocurre con la proteína reguladora de la esteroidogénesis (StAR), caracterizada molecularmente en la lubina europea por Rocha et al. (2009). Esta proteína determina el paso limitante de la síntesis de esteroides en mamíferos (Stocco, 2000). En peces, existen evidencias de que las gonadotropinas pueden modular la acción de la StAR (Sambroni et al., 2013; Xie et al., 2017), y la Amh inhibir su expresión en las células de Leydig (Skaar et al., 2011). En la lubina europea se sabe muy poco al respecto, aunque un estudio realizado por Rocha et al. (2009) ha demostrado que esta enzima tiene un patrón de expresión diferencial a medida que progresa la espermatogénesis. De acuerdo con todas estas observaciones, en la presente tesis el tercer objetivo que se planteó fue analizar los perfiles de las principales hormonas del eje cerebro-hipófisis-gónada implicadas en el proceso de maduración sexual de la lubina y los patrones de expresión de los genes *amh*, *erβ1*, *erβ2* y *star* con la finalidad de conseguir entender la regulación hormonal de la maduración sexual en esta especie. Así, un estudio comparativo entre animales sometidos a un fotoperíodo natural y LL permitirá evaluar qué factores son importantes en la regulación endocrina del proceso espermatogénico y por tanto claves en la pubertad prematura de la lubina.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El presente estudio tiene como **objetivo principal** localizar un periodo durante la gametogénesis tanto en el primero como en el segundo año de vida de los animales, que sea sensible a un tratamiento fotoperiódico específico de luz continua de corta duración (menos de cuatro-seis meses) que pueda disminuir significativamente la pubertad prematura de la lubina y/o alterar el proceso gametogénico. También, esclarecer los mecanismos endocrinos que están implicados en el inicio de la maduración precoz en esta especie, así como evaluar los efectos de la luz continua sobre el denominado eje endocrino cerebro-hipófisis-gónada.

Objetivos específicos:

1. Acotar, aplicando regímenes de luz continua de un mes de duración, períodos del proceso gametogénico entre agosto a octubre sensibles al tratamiento fotoperiódico (**capítulo 4, artículo 1**).
2. Evaluar el efecto de los distintos tratamientos fotoperiódicos, aplicados en el intervalo de tiempo de agosto a octubre, sobre la gametogénesis y la regulación hormonal a nivel del eje cerebro-hipófisis-gónada (**capítulo 5, artículo 2**).
3. Esclarecer la acción diferencial de los distintos tratamientos fotoperiódicos en el desarrollo de la gametogénesis y su regulación hormonal al primer y segundo año de vida de los animales (**capítulo 6, artículo 3**).

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 REGÍMENES FOTOPERIÓDICOS Y ANIMALES

Se aplicaron distintos regímenes de luz continua (LL) usando bombillas de tungsteno (Philips, PAR38Pro) controlados por medio de temporizadores, y colocados a unos 40 cm de la superficie del agua en cada tanque. Cada fuente de luz suministraba entre 650-700 lumex, medidos a nivel de la superficie del agua.

Se realizaron un total de tres ensayos (T) en años diferentes. El primero (T1) (**capítulo 4, artículo 1**) consistió en aplicar cinco regímenes fotoperiódicos diferentes: Luz continua constante (LL) durante todo el año (G1LL, control negativo); LL desde el 1 de agosto hasta el 30 septiembre (G2AS); LL desde el 1 de septiembre hasta el 1 de octubre (G3SO); LL desde el 1 de octubre hasta el 30 de noviembre (G4ON) y fotoperiodo natural simulado constante (SNP, control positivo). Este ensayo comenzó en mayo, y se usaron 400 peces con un peso promedio de 4,5 gramos que se obtuvieron de la empresa Aquanord (Gravelines, Francia). Los peces se distribuyeron uniformemente en 5 tanques de 2000 litros cada uno. El segundo ensayo (T2) (**capítulo 4, artículo 1**) consistió en la aplicación de seis regímenes fotoperiódicos diferentes: Luz continua constante durante todo el año (G1LL, control negativo); LL desde el 1 de agosto hasta el 30 septiembre (G2AS); LL desde el 1 de agosto hasta el 30 de agosto (G3AA); LL desde el 15 de agosto hasta el 15 de septiembre (G415AS), LL desde el 1 de septiembre hasta 30 de septiembre (G5SS) y (SNP, control positivo). El ensayo se inició en mayo y cada régimen fotoperiódico se aplicó por duplicado sobre un total de 3000 peces procedentes también de Aquanord y un peso promedio de 4 gramos. Para este ensayo los peces se distribuyeron uniformemente en 12 tanques con una capacidad de 2000 litros cada uno. En ambos experimentos, y salvo en aquellos grupos sometidos a LL durante todo el experimento, en los periodos donde no se aplicó luz continua, se aplicó fotoperiodo natural simulado. El tercer ensayo consistió de 3 sub-ensayos (T₁, T₂ y T₃) (**capítulo 6, artículo 3**) en los cuales se combinaron diferentes fotoperiodos durante dos ciclos anuales consecutivos. En T₁ se comparó un régimen de fotoperiodo natural simulado (NP) respecto a uno de luz continua (LL) durante dos ciclos anuales consecutivos. Para este estudio se emplearon un total de 800 peces (405 peces/tanque). En T₂ se utilizó un régimen de NP durante dos ciclos anuales consecutivos respecto a uno con LL desde el 1 de junio al 1 de octubre (primer ciclo anual) y luego con LL desde el 15 de agosto hasta el 31 de octubre (segundo ciclo anual), pasado este periodo se sometieron a un fotoperiodo natural simulado (LLJO-AO). En este

experimento se usaron un total de 180 peces (90 peces/tanque). En T₃ se compararon inicialmente 2 grupos, uno sometido a NP y el otro a LL durante el primer ciclo anual, luego ambos grupos se subdividieron en dos, para dar lugar a un total de 4 tratamientos en los que los animales se sometieron o bien a NP o a un fotoperiodo constante largo de 15 horas de luz y 9 horas de oscuridad 15L:9D (LP), durante el segundo ciclo anual; NP-NP, NP-LP, LL-NP y LL-LP. En este último experimento se utilizaron un total de 348 peces (174 peces/tanque) durante el primer ciclo, 80-82 peces/tanque durante el segundo ciclo.

Todos los peces se mantuvieron bajo temperatura natural, entre un rango de 12 y 25 ± 1°C, y alimentados a saciedad aparente, mediante alimentadores automáticos con granos “pelet” de la empresa Proaqua Nutrición S.A. (Palencia, España) (proteína 54–45%, lípidos 20–12%, carbohidratos 9–25%, cenizas 11%, humedad 1–3%, and DE 22,4–19,7 MJ.kg 22,4–19,7 MJ kg⁻¹). La dieta se ajustó siguiendo las instrucciones del fabricante de piensos y teniendo en cuenta la temperatura y la biomasa.

3.2 ANÁLISIS BIOMÉTRICO, MORFOLÓGICO Y PRECOCIDAD

El peso y la talla de todos los individuos se registró mensualmente desde el inicio de cada uno de los experimentos (**Fig. 3.1**). Ambas variables se midieron con una precisión de 0,01 g y 0,1 cm, respectivamente. La tasa de espermiación se estimó mensualmente, desde el mes de diciembre en adelante, en todos los peces mediante masaje abdominal. En los dos primeros ensayos (T1 y T2), un total de 20 peces por tratamiento se anestesiaron mensualmente con etilen glycol-monofenil éter (0,5 ml/l de agua) y se sacrificaron mediante un corte rápido a nivel de la médula oblongata para luego tomar muestras de sus gónadas que se pesaron y se fijaron para su posterior análisis histológico. Igualmente se tomaron muestras de sangre mediante punción caudal y muestras de cerebro y hipófisis para análisis posteriores.

Asimismo, se calculó la tasa de crecimiento específico para el peso (GW) y para la talla (GL), el índice gonadosomático (IGS) y el factor de condición (FC), mediante las siguientes fórmulas:

CAPÍTULO 3 MATERIALES Y MÉTODOS

$$GW = 100 (\ln W_f - \ln W_i) t^{-1}$$

$$GL = 100 (\ln L_f - \ln L_i) t^{-1}$$

$$IGS = 100 \times Gw/Bw$$

Donde W_f y W_i representan el peso en gramos final e inicial del pez, respectivamente. L_f y L_i la longitud en centímetros final e inicial, respectivamente, Bw el peso corporal en gramos y Gw el peso de la gónada en gramos.



Figura 3.1. Medición de la longitud del pez mediante tabla graduada.



Figura 3.2. Pez abierto en canal para la extracción de las gónadas, previa extracción de sangre a través de la vena caudal. El sacrificio del animal se realiza mediante sección de la médula a nivel bulbar.

3.3 HISTOLOGÍA GONADAL

El tejido testicular se fijó durante 24 horas en una solución al 4% de formaldehído y 1% glutaraldehído en tampón salino (McDowell y Trump 1976). Posteriormente, las muestras se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes, de 70 a 96%, y luego se embebieron en una resina de glicol-metacrilato (Technovit 7100; Heraeus, Kulzer, Alemania). Las muestras se procesaron usando la técnica de Cleveland-Wolf y se cortaron en secciones de 4 μm de grosor previamente a su tinción (Herland, 1960). La identificación y caracterización de los estados de desarrollo gonadal se realizó según los criterios descritos en el trabajo de Begtashi et al. (2004). Los estados de desarrollo gonadal IV y V se tomaron como indicadores de la maduración sexual dado que una de las características distintivas en estos estados es la presencia de espermatozoides en el testículo. Además, el estado V indica que la espermiogénesis ha finalizado y el pez se considera completamente maduro (“running”).

3.4 ANÁLISIS HORMONAL

Para el análisis de las hormonas 11-KT, T, E2, Lh y Fsh se tomaron muestras de sangre que se extrajo de la vena caudal del pez usando jeringas de

1 ml previamente heparinizadas. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 r.p.m durante 30 min a 4°C y se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis. El análisis de los esteroides se hizo mediante inmunoensayos del tipo ELISA (**Fig. 3.3**). La evaluación de los niveles plasmáticos de T se realizó siguiendo la metodología descrita por Rodríguez et al. (2000), la 11-KT de acuerdo a Rodríguez et al. (2005) y E₂ según Molés et al. (2008). Las gonadotrofinas se evaluaron según Mateos et al. (2006) en el caso de la Lh y Molés et al. (2012) para la Fsh. Para el análisis de las GnRHs, se obtuvieron muestras individuales de cerebro, las cuales se extrajeron bajo condiciones de 80°C añadiendo 500 ul de 2 N de ácido acético. Las muestras se mantuvieron en hielo y posteriormente se centrifugaron (4 °C, 30 min y 10.000 g) para recoger el sobrenadante. Los pelets obtenidos se secaron al aire y se reconstituyeron con una solución tampón para su posterior análisis. La sbGnRH y cGnRH-II se midieron mediante ensayos ELISA como describió anteriormente Holland et al. (1998). La sGnRH se midió siguiendo la metodología descrita por Kah et al. (1994).

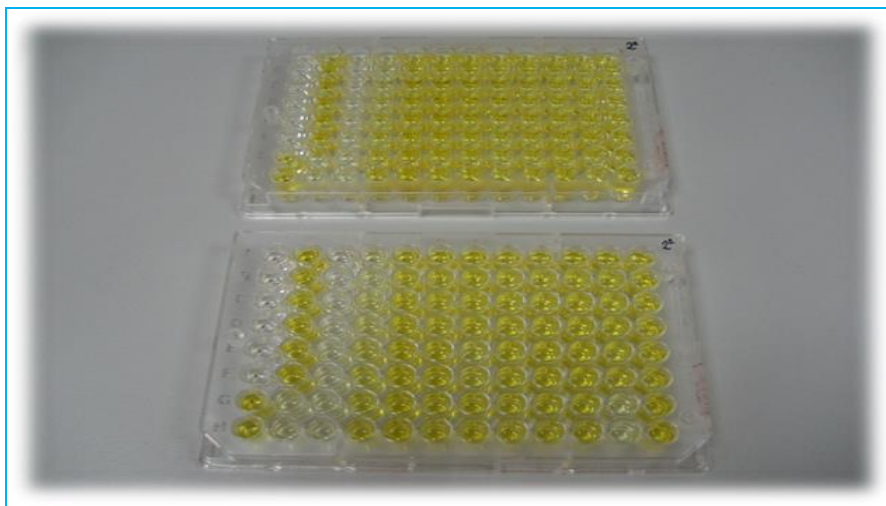


Figura 3.3. Placa utilizada para el análisis mediante ELISA de las distintas hormonas estudiadas.

3.5 EXPRESIÓN DE GENES

Se evaluó la abundancia relativa de mRNA, de la β -subunidad de la Fsh (*fsh β*), los receptores de estrógenos (*er β 1* y *er β 2*), la hormona anti-Mülleriana

CAPÍTULO 3 MATERIALES Y MÉTODOS

(*amh*) y la enzima reguladora de la esteroidogénesis (*stAR*), usando la técnica de PCR a tiempo real (qRT-PCR). La extracción y cuantificación de RNA y la reacción de transcripción reversa, se realizó de acuerdo con Felip et al. (2008). En cada muestreo se evaluó la expresión de *fsh β* en la hipófisis siguiendo la metodología de Felip et al. (2008), usando un total de 20 muestras por tratamiento. Además, se midió la expresión de los genes *er β 1* y *er β 2* (Blázquez et al., 2008), *stAR* (Rocha et al., 2009) y *amh* (Crespo et al., 2013) en gónadas, haciendo “pooles” de dos-tres gónadas con valores similares de 11-KT y E₂ para cada tratamiento, y cada punto de muestreo. Se evaluaron entre 6 y 10 pooles por tratamiento. La amplificación de la PCR se llevó a cabo en un sistema iQCyler iQ Multi-Color Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) de acuerdo con Felip et al. (2008). Para medir la expresión de cada gen, el cDNAs de cada muestra se analizó en pocillos separados por duplicado, usando placas de 96 pocillos (Abgene, UK). Tanto en hipófisis como en gónadas se tomaron como referencia la expresión del 18S rRNA para normalizar los datos.

La preparación de cada reacción de PCR para la *fsh β* , receptores de estrógenos y 18S rRNA consistió de 1 μ l de cDNA de cada muestra (diluida 1:500 en el caso de *fsh β* y 18S, y diluida 1:1 en el caso de los receptores de estrógenos), 0,5 μ l de cada cebador (50 pmol de cebadores de *fsh β* y 10 pmol cebadores de los receptores de estrógenos y 18S), 12,5 μ l de SYBER Green PCR Master Mix (Applied Bio systems, UK) y 10,5 μ l de agua estéril, en un volumen final de 25 μ l. La preparación de la reacción de PCR para los genes *amh* y *star* consistió de 1 μ l de cDNA de la muestra (diluido 1:1), 0,13 μ l del cebador “forward” (10 pmol), 0,75 μ l del cebador “reverse”, 0,33 μ l de la sonda TaqMan (10 pmol), 12,5 μ l de Absolute qPCR mix (Bbgene, UK) para ensayos basados en sondas TaqMan y 10,29 μ l de agua estéril en un volumen final de 25 μ l. Los distintos cebadores empleados para cada reacción de PCR se muestran en la **Tabla 3.1**.

CAPÍTULO 3 MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.1. Características de los cebadores y método de detección empleado para los análisis de expresión génica mediante q-RT-PCR.

Gen	Método de detección	5' to 3' secuencia	Tamaño (bp) ^a	nM ^b	Eficiencia (%) ^c
18S rRNA (AM419038) ^d (Felip et al., 2008)	SYBR Green	F: GCATGCCGGAGTCTCGTT R: TGCATGGCCGTTCTTAGTTG	70	200 200	103
<i>fshβ</i> (AF543314) (Felip et al., 2008)	SYBR Green	F: TCGATAGTACGTGTCTGTGCT R: CACTTGGATGCTGATGTTGG	131	200 200	99
<i>erb1</i> (AJ489523) (Blázquez et al., 2008)	SYBR Green	F: CTGTCCTCACAGAGTAGAACAC R: GCAGGTGCACCTGGTCCAAG	295	200 200	99
<i>erb2</i> (AJ489524) (Blázquez et al., 2008)	SYBR Green	F: GTGGACTCCAGACTCGGGAC R: ATCATGCTAGCCTCGGTGAAG	246	200 200	98
<i>amh</i> (AM232701) (Crespo et al., 2013)	Sonda TaqMan	F: TCCAAACACTGCTAACATCAACAA R: TGGCGTGTTCTTGGGATT pr:[6~FAM]CCATGGCTCATGTGCTTTCC CCCT[TAMRA]	74	50 300 125	90
<i>star</i> (EF409994) (Rocha et al., 2009)	Sonda TaqMan	F: GGCTGGATCCCGAAGACAA R: CCTGAGGTGGTTGGCAAAGT pr:[6~FAM]CATAACAAAGTGCTCTCTC AGACGCAGGTG[TAMRA]	72	900 900 75	98

Abreviaturas: F, cebador “forward”; R, cebador “reverse”; pr, sonda. ^aTamaño en pares de bases del producto de amplificación (amplicón). ^bCantidad de cebador o de sonda en la reacción de PCR. ^cEficiencia de la reacción de PCR bajo las condiciones descritas. ^dNúmeros de acceso en el GenBank para los genes de lubina indicados.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se transformaron logarítmicamente y se analizaron mediante un análisis de la varianza ANOVA de dos vías para determinar posibles diferencias significantes entre los diferentes regímenes fotoperiódicos y los niveles plasmáticos de las distintas hormonas estudiadas. El test de Kolmogorov-Smirnoff se usó para verificar la normalidad de los datos y el test de Barlett para verificar la homogeneidad de las varianzas. Los valores promedios de las distintas variables estudiadas se expresaron como la media \pm SEM y las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$ (Sokal y Rohlf, 1981). Un test de Chi-cuadrado se empleó para comparar los porcentajes de individuos espermiantes y de individuos en estados avanzados del desarrollo gonadal entre los diferentes grupos. Un análisis de regresión lineal se empleó para relacionar el porcentaje de individuos espermiantes y los parámetros biométricos, tomando en cuenta los resultados de los diferentes ensayos. El análisis estadístico se realizó usando los programas SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) y Sigma Plot 11.0 para Windows (Systat Software Inc., Alemania).

CAPÍTULO 4
ARTÍCULO 1

IDENTIFICATION OF A PHOTOLABILE PERIOD FOR REDUCING SEXUAL MATURATION IN JUVENILE MALE SEA BASS (*Dicentrarchus labrax*) BY MEANS OF A CONTINUOUS LIGHT REGIME

Publicado en *Aquaculture International* 2012, 20(6): 1071–1083

Rafael Rodríguez¹ Alicia Felip¹ Vinicius Cerqueira² Edmond Hala³ Silvia Zanuy¹ and Manuel Carrillo¹

¹Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain.

²Universidade Federal de Santa Catarina CCA, Departamento de Aqüicultura, CP, Centro de Ciências Agrárias-Departamento de Aqüicultura, Caixa Postal 474, Florianópolis 88040.900, Santa Catarina, Brasil.

³Agricultural University of Tirana Faculty of Agriculture and Environment Department of Animal Production Kamez, Tirana - Albania

Introduction

The early onset of puberty is a common feature in species of interest in aquaculture, such as *Oreochromis niloticus* (Longalong et al. 1999), *Sparus aurata* L. (Ginés et al. 2003), *Hippoglossus hippoglossus* (Weltzien et al. 2003), *Gadus morhua* L. (Karlsen et al. 2006), *Perca flavescens* (Shewmon et al. 2007), *Salmo salar* (McClure et al. 2007), and *Dicentrarchus labax* L. (Felip et al. 2008). Precocious maturation before the fish are marketed affects the production parameters, as it changes the appearance of the fish and causes a general decrease in their somatic growth (Carrillo et al. 2010; Taranger et al. 2010).

The mechanisms that regulate puberty in fish are not yet fully understood. However, it is known that genetic factors, metabolic signals, and environmental stimuli (Nocillado and Elizur 2008) trigger a hormonal cascade along the brain–pituitary–gonad axis. Steroids [testosterone (T), 17- β estradiol (E₂), and 11-ketotestosterone (11-KT)] produced and released by the gonads are the last link

in this hormonal cascade, which plays an important role in gonadal growth. Among these hormones, 11-KT is the major androgen produced in the testicles of teleost fish. It is important because it promotes spermatogonial proliferation, leading to meiosis and the later stages of spermatogenesis (Miura et al. 1991; Schulz and Miura 2002). For this reason, this androgen has been proposed as a possible trigger for the onset of puberty in sea bass (Rodríguez et al. 2005).

Among environmental stimuli, the photoperiod is considered to be one of the most important in terms of modulating the onset of puberty in fish. In fact, it has been proposed that fish species living in temperate zones perceive the photoperiodic change occurring after the summer solstice and this serves as an external signal that triggers the onset of puberty (Bromage et al. 2001). On the other hand, the masking of this external signal by a continuous light regime prevents the onset of sexual maturation in these fish (Davie et al. 2007). Consequently, continuous light regimes have been effective in reducing precocious maturation in salmonids (Taranger et al. 1998), Gadidae (Davie et al. 2007), flatfishes (Imsland et al. 2003; García-López et al. 2006), and Perciforms, including sea bass (Migaud et al. 2004; Begtashi et al. 2004; Felip et al. 2008).

In sea bass, one of the most important species in European aquaculture, sexual maturity occurs in nature during the second year of life in males and during the third year of life in females. However, under aquacultural conditions, there is a high proportion (20–30%) of males that exhibit precocious maturation during the first year of life, before they can be sent to the market. Additionally, the sex ratio between males and females in aquacultural facilities is usually 3:1 (Carrillo et al. 1995). Therefore, almost 70% of the fish populations are male individuals, 20% of which exhibit precocity. This seriously affects the aquacultural profitability of the species, because precocious males are significantly larger than non-precocious males during the first year of life, but they exhibit lower growth rates (18%) by the second year (Felip et al. 2008).

Photoperiodic control has also been used to reduce early puberty in sea bass (Carrillo et al. 2009). In fact, male sea bass precocity was reduced to <3% when a regime of continuous light was applied throughout the entire first year of life (Begtashi et al. 2004). Chronic exposure to continuous light, however, can produce a permanent stress condition that may diminish their immune response to bacterial infections (M. Carrillo, unpublished data). Furthermore, like other marine species of interest in aquaculture, sea bass can be raised in outdoor facilities where it is not always easy to maintain long-term regimes of continuous light (Taranger et al. 2010). Therefore, it would be interesting to discover shorter photoperiod regimes that permit both decreasing male precocity and reducing the negative impact of continuous light on sea bass health. Felip et al. (2008) showed that continuous light regimes applied for 4 and 6 months during pregametogenesis and gametogenesis, respectively, were able to reduce the rate of male precocity in sea bass to a value similar to that obtained by Begtashi et al. (2004) in males maintained under continuous light conditions (LL) year round. Moreover, Felip et al. (2008) suggest that there may be a shorter period of sensitivity to LL between August and November that might be used to significantly reduce sea bass precocity.

The aim of the present work was to screen out a period with continuous light exposure between August and November, capable of reducing sea bass male precocity. To accomplish this goal, we conducted a trial (Trial 1) using a 2-month LL window to identify an ample photolabile period of time between August and November. Based on this trial results, we conducted a second trial (Trial 2), using a 1-month LL window, in order to screen out and refine the 2-month period previously identified in Trial 1 (August–September). As indicators of the effects of continuous light on the reduction of precocity, the gonadosomatic index (GSI), 11-KT plasma levels, rates of spermiating fish, and individuals at stage IV + V were determined, during the period of maximum spermiation, for prepubertal male sea bass subjected to the different light regimes. In addition, a linear regression analysis was performed for the rate of spermiating males versus biometric parameters (i.e., weight and length).

Materials and methods

Animals and photoperiodic regimes

Artificial continuous light regimes of varying durations were applied using tungsten lightbulbs (Philips, PAR38Pro), controlled by means of electronic clocks, and located at the water surface of each tank. This light source produced 650–700 lx at surface level. Two experimental trials were carried out. The first trial consisted of 400 juveniles with an average weight of 4.5 g, obtained from Aquanord (Gravelines, France). In May, the specimens were evenly distributed among five lightproof tanks with a capacity of 2,000 l and subjected to the following light regimes: constant continuous light (LL) (G1LL); LL from August 1 to September 30 (G2AS); LL from September 1 to October 30 (G3SO); LL from October 1 to November 30 (G4ON); and constant simulated natural photoperiod (SNP) (Fig. 4.1a). The second trial consisted of 3,000 juvenile fish with an average weight of 4.0 g, obtained from the same hatchery during a different year. In May, these fish were evenly distributed into 12 lightproof tanks with a capacity of 2,000 l. Six experimental groups were organized in duplicates as follows: constant continuous light (LL) (G1LL); LL from August 1 to September 30 (G2AS); LL from August 1 to August 30 (G3AA); LL from August 15 to September 15 (G415AS); LL from September 1 to September 30 (G5SS); and SNP (Fig. 4.1b). In both trials, a SNP was also used outside the LL window proper for all those groups subjected to a temporal window of constant light.

Morphological and precocity analysis

The fish were anesthetized with ethylene glycol-monophenyl ether (0.5 ml/l of water) and killed by a quick cut at the level of the medulla oblongata in February and March (Trials 1 and 2). Gonads were collected, weighed, and kept for further histological analysis. Size (with a precision 0.1 cm) and weight (with a precision 0.01 g) were recorded on a monthly basis from the beginning of the experiment. Every month from December onwards, the rates of spermiating males (assessed by a gentle abdominal massage) were determined and blood sample were obtained by caudal puncture. The GSI was calculated as: $GSI = 100 \times Gw/Bw$, where Bw = body weight and Gw = gonad weight.

All fish were maintained under natural temperature conditions, which ranged between 12 and $25 \pm 1^\circ\text{C}$, and were fed to apparent satiety using automatic feeders with pellets from Proaqua Nutrición S.A. (Palencia, Spain) (protein 54–45%, lipids 20–12%, carbohydrates 9–25%, ash 11%, moisture 1–3%, and DE 22.4–19.7 MJ kg⁻¹). The feed doses were adjusted according to temperature and biomass, following the instructions provided by the suppliers.

Hormonal analysis

Blood samples were collected from the caudal vein using heparinized syringes. They were then centrifuged at 3,000 rpm for 30 min at 4°C and stored at -20°C until further analysis. 11-KT plasma levels were determined by an EIA, as described by Rodríguez et al. (2000).

Testis histology

Testes were fixed for 24 h in 4% formaldehyde/1% glutaraldehyde buffered saline (McDowell and Trump 1976), dehydrated in a 70–96% ethanol series, and then embedded in glycol-methacrylate resin (Technovit 7100; Heraeus, Kulzer, Germany). Using the Cleveland–Wolf technique, 4- μm sections were stained (Herland 1960). Identification and characterization of the stage of testicle development were performed according to Begtashi et al. (2004). Stages IV and V were taken as indicators of maturity, as one of their distinctive characteristics is the presence of spermatozoids; by stage V, the spermiogenesis process has finished, and the fish are considered as running.

Statistical analysis

A one-way ANOVA after logarithmic transformation of the data was performed to determine possible significant differences between the effects of the different photoperiodic regimes on 11-KT plasmatic levels and GSI. A Kolmogorov–Smirnov–Barlett's test was used to verify the normality of the data. The data for both variables were expressed as mean \pm SEM, and the differences were considered to be significant when $P < 0.05$ (Sokal and Rohlf 1981). A chi-square test was used to compare the percentages of spermiating males and individuals in advanced gonadal stages among the different groups. A linear regression analysis was applied to the relationship between the percentage of spermiating males and both biometric parameters, taking into account the results of the present study and others previously conducted in our laboratory. Statistical

analyses were carried out using the SPSS 15.0 for Windows package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and Sigma Plot 11.0 for Windows (Systat Software Inc., Germany).

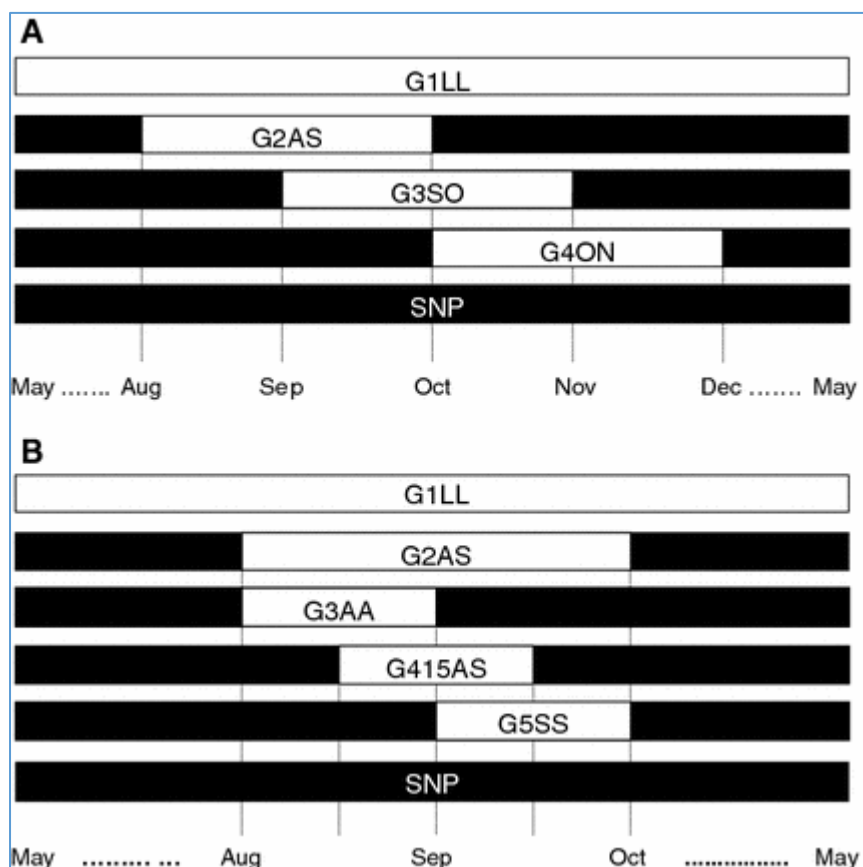


Figura 4.1. Photoperiod regimes applied in the present study. A Trial 1. G1LL: constant continuous light (LL); G2AS: LL from August 1 to September 30; G3SO: LL from September 1 to October 30; G4ON: LL from October 1 to November 30; SNP: constant simulated natural photoperiod. B Trial 2. G1LL: constant continuous light (LL); G2AS: LL from August 1 to September 30 (the photolabile period identified in Trial 1); G3AA: LL from August 1 to August 30; G415AS: LL from August 15 to September 15; G5SS: LL from September 1 to September 30; G6: constant SNP.

Results

Average weight, size, and rates of precocity recorded in Trials 1 and 2 during February, the period of maximum spermiation, are depicted in Fig. 4.2. The data used for Trial T0 were taken from Begtashi et al. (2004) in order to establish

comparisons with Trials T1 and T2. High weight and length values were associated with elevated precocity. Consequently, the fish in T1, with greater weights and sizes than those in T2, also presented higher rates of precocity. Linear regressions between the rate of spermiating males and biometric parameters (weight and length), taken from different authors, are shown in Fig. 4.3. Significant ($P = 0.012$, $P = 0.022$) positive correlation ($r = 0.753$, $r = 0.708$) was observed between the spermiation rate and the fish weight and size, respectively.

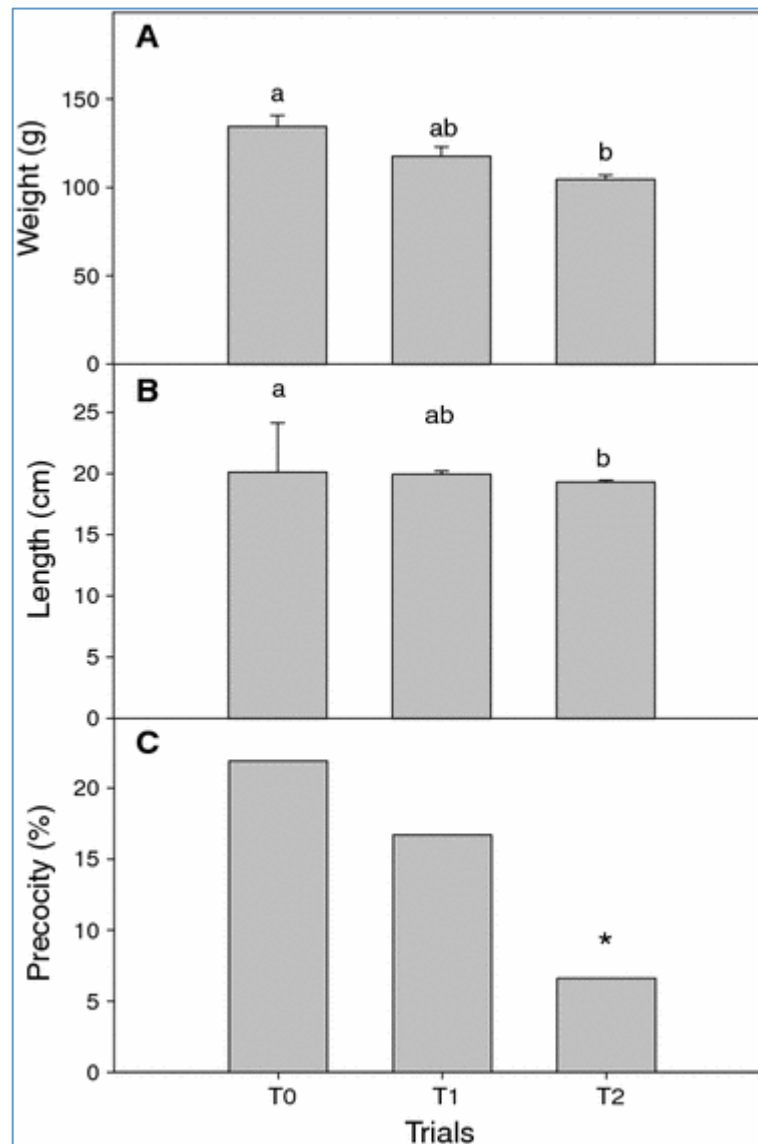


Figure 4.2. Average weight (A), length (B), and precocity (C) of different fish populations (T0 from Begtashi et al. 2004; T1 and T2 from the present study) during the month of February (maximum spermiation period). Different letters indicate significant ($P < 0.05$) differences among groups. The asterisk above T2 indicates significant differences with respect to the T1 and T0 trials.

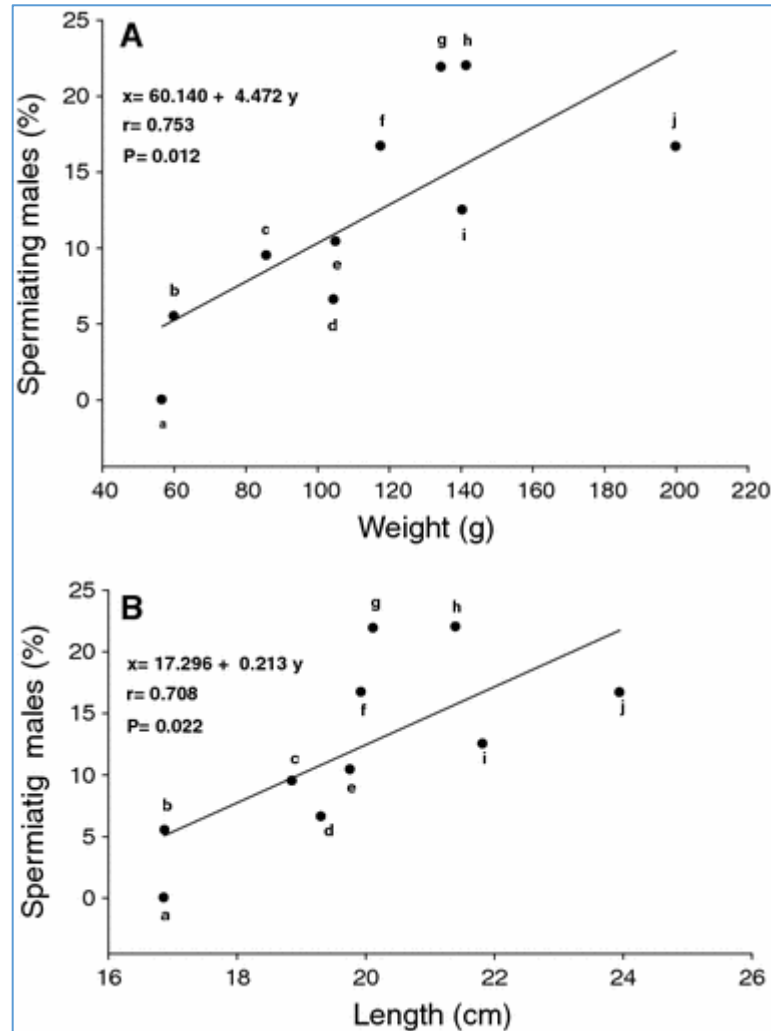


Figura 4.3. Linear regression for the rate of spermiating males versus fish weight (A) and length (B) for prepubertal male sea bass assessed during the period of maximum spermiation. The data points come from the following sources: *a* = Zanuy, personal communication; *b* = Rodríguez et al. (2001); *c* = Zanuy, personal communication; *d* = Present study (T2); *e* = Bayarri et al. (2009); *f* = Present study (T1); *g* = Begtashi et al. (2004); *h* = Bayarri et al. (2009); *i* = Felip et al. (2008); *j* = Bayarri et al. (2009).

Trial 1

The percentages of spermiation and gonadal stage IV + V (Fig. 4.4a) run roughly parallel, with G1LL and G2AS presenting very low values for both variables (0.00%, 4.34% and 2.5%, 2.70%, respectively) (shaded area in Fig. 4.4a), while the SNP and G4ON groups registered the maximum values (16.70%, 6.47% and 30.43%, 28.95%, respectively). Despite exhibiting a percentage of spermiation (2.17%) significantly lower than that of the G4ON and SNP groups, the percentage of gonadal stage IV + V for the G3SO group was relatively high (18.42%), but failed to show any significant differences with respect to the rest of the groups. Groups G1LL and G2AS also presented the lowest GSI values (0.05% and 0.09%, respectively) (shaded area in Fig. 4.4b), while the other groups presented high values that were closer to SNP (0.68%). The lowest values for plasma 11-KT were once again exhibited by groups G1LL and G2AS (0.71 ng/ml and 0.46 ng/ml) (shaded area in Fig. 4.4c), and the highest values by the rest of the groups. Collectively, these data indicated that the August–September period (G2AS group) was the time interval in which the fish were more sensitive to the photoperiod treatment; for this reason, it was chosen as the candidate to be used in Trial 2, where a further screening was performed to refine the localization of the photolabile period.

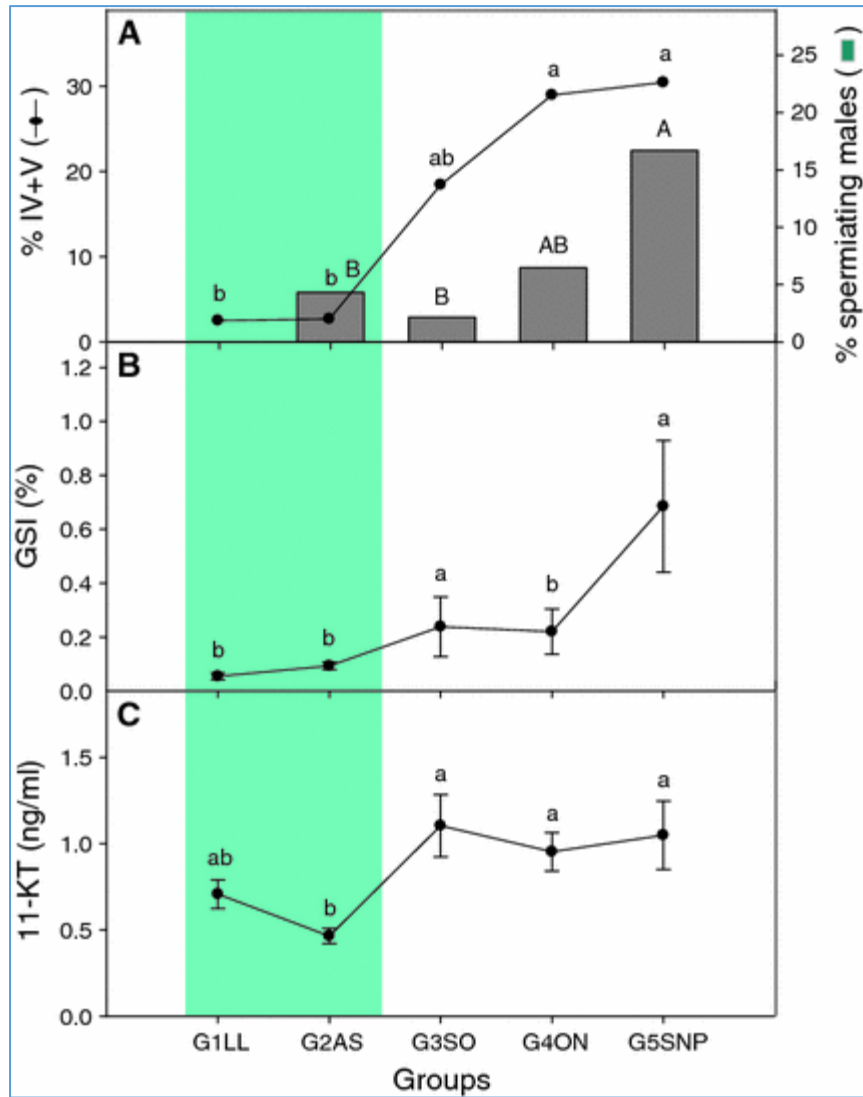


Figura 4.4. Indicators of the maturation process in juvenile male sea bass kept under different 2-month photoperiod regimes of LL. **A** Total rates of spermiating fish (*solid bars*) throughout the sexual cycle, from October to May, and fish at stage IV + V (*black filled circles and solid line*) in February and March. **B** Gonadosomatic index (GSI) in February. **C** 11-KT plasma levels in February. The photoperiodic regime references shown in this figure are explained in Fig. 1a. *Different letters* indicate significant ($P < 0.05$) differences among treatments. The *shaded area* includes the group displaying the maturation indicator values most similar to those of the G1LL group.

Trial 2

As it was the case in Trial 1, the spermiation rates roughly correlated with the rates of fish at stage IV + V, with the lowest (0.00 and 0.00%) and highest (6.60 and 26.10%) values being exhibited by G1LL and SNP, respectively. The rest of the groups presented intermediate positions (Fig. 4.5a). However, the G2AS and G5SS groups showed values (0.60%, 17.20% and 1.50%, 10.70%, respectively), which were closer to those of G1LL than the rest of the groups (shaded area in Fig. 4.5a).

All groups showed similar GSI values (nearly 0.04%), the only exception being G3AA, whose values were significantly higher (0.09%) than those of the control group (0.05%) (Fig. 4.5b). 11-KT plasma levels are shown in Fig. 5c. The lowest values (0.34, 0.33, and 0.43 ng/ml) were found in groups G1LL, G2AS, and G5SS, respectively (shaded area in Fig. 4.5c), while the highest value (0.98 ng/ml) corresponded to the SNP group. The other groups occupied intermediate positions and failed to show significant differences. Figure 4.2 shows average size and weight values in February for the entire fish population during Trials T1 and T2. Also included is another trial (T0) from a different author, for comparison purposes only. Our study supports the hypothesis that larger fish produce more precocious fish than smaller individuals, since the larger weight and size of the T1 population compared to the T2 population (117.63 ± 5.26 g and 19.93 ± 0.28 cm vs. 104.54 ± 2.23 g and 19.31 ± 0.13 cm, respectively) was also matched by a higher precocity rate (16.70 and 6.60% for T1 and T2, respectively). Figure 4.3 shows the linear regression of the relationship between the percentage of spermiating fish and the average weight and length of different fish populations assessed during the month of February. The regression lines indicate a strong, significant correlation in both cases.

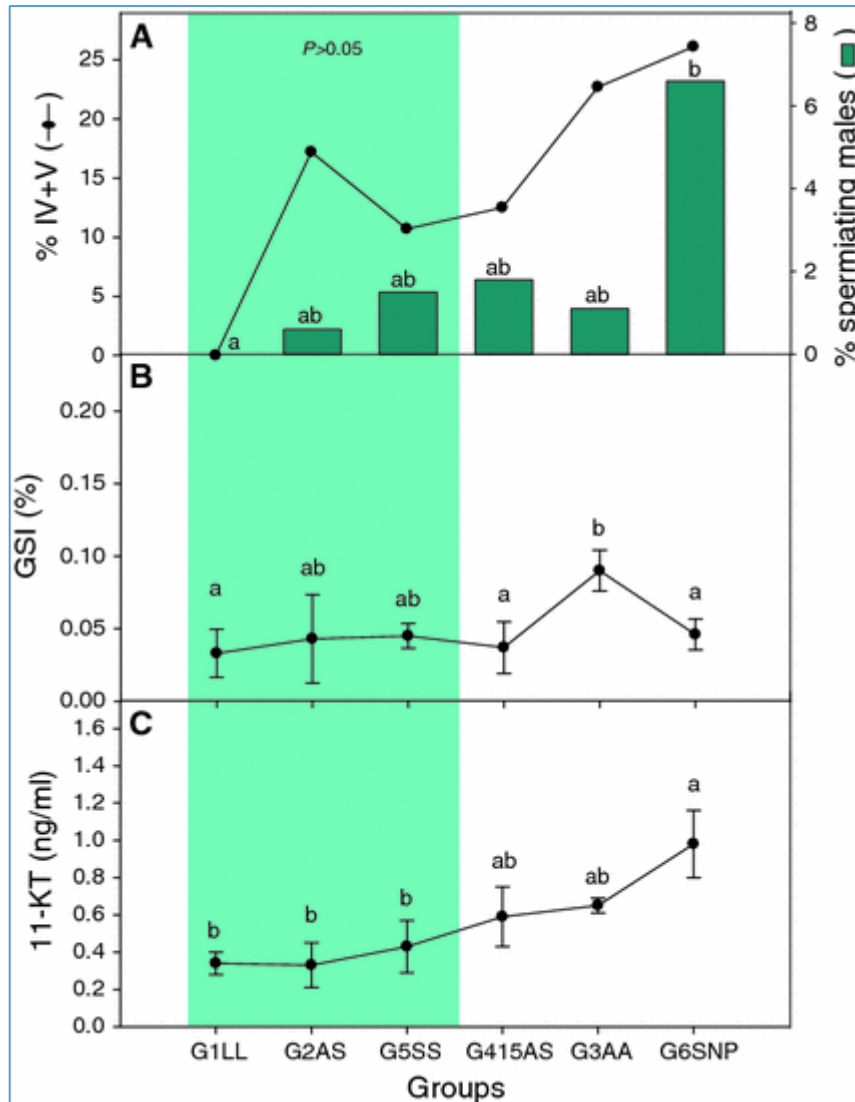


Figura 4.5. Indicators of the maturation process in juvenile male sea bass kept under different 1-month photoperiod regimes of LL, assessed during February. **A** Total rates of spermiating fish (solid bars) throughout the sexual cycle from June to May, and fish at stage IV + V (black filled circles and solid line) in February and March. **B** Gonadosomatic index (GSI) in February. **C** 11-KT plasma levels during February. The photoperiodic regime references shown in this figure are explained in Fig. 1b. Different letters indicate significant ($P < 0.05$) differences among treatments. The shaded area includes those groups displaying the maturation indicator values most similar to those of the G1LL group.

Discussion

This is the first study to have successfully localized a precise photolabile period for the inhibition of precocity in sea bass by screening specific periods with continuous light exposure within a 4-month time interval falling between August and November. Many studies evidence that masking the autumnal reduction in photoperiod by means of continuous light (LL) inhibits the onset of early puberty in different species of fish that are of interest in aquaculture (Taranger et al. 2010). In the case of sea bass, the first evidence that LL exposure effectively reduces gonadal development, thereby preventing the appearance of precocious males, was obtained by Begtashi et al. (2004) using a 12-month consecutive treatment with LL. A few years later, Felip et al. (2008) presented evidence that a 4- or 6-month exposure to LL either during pregametogenesis (June–September) or gametogenesis (October–March) was equally effective in reducing the number of early maturing males. Furthermore, these authors have also hypothesized that a potential photolabile period may exist in the case of sea bass, possibly located sometime during the autumn, between the months of August and September. Our studies have long supported this hypothesis. As a first approach, the proposed 4-month period between August and November was screened using 2-month windows of LL. This led to the identification of a photolabile period (associated with significantly lower rates of gonadal maturation, GSI values, and 11-KT plasma levels) shorter than the one previously identified and positioned between August and September. Other periods, such as October–November (G4ON) or September–October (G3SO), were unresponsive or not so responsive to the LL treatment and, therefore, were discarded as possible targets for therapies aimed at reducing precocity. Once this photolabile period was identified, a second approach was used to refine the localization of this period, screening the time interval of August–September with LL windows of 1 month in duration. The results, based on the effects of the different LL treatments on 11-KT plasma levels, permitted restricting the photolabile period to September, as this appeared to be the most sensitive period in which application of LL might significantly reduce the precocious gametogenic process in prepuberal sea bass. Other groups, such as G3AA and G415AS, were discarded as suitable photolabile candidates because most of their maturation indicators were very close to the values of the SNP group or occupied intermediate positions, which suggested that LL exposure during these specific periods did not induce any relevant reduction of the gametogenetic

process. It is interesting to note that Molés et al. (2007) also reported a peak in pituitary GnRHs, GnRH-R, and gonadotropin mRNA expression during the month of September (200 days after hatching) in prepubertal male sea bass. Rocha et al. (2009) further described relatively high mRNA levels of gonadotropin receptor FSHR and mCYP11B1 (a gene that encodes an enzyme required for the final steps of 11-KT synthesis) in fish at stage I of gonadal maturation, again during September. Collectively, these data support the hypothesis that September may be the key period in which the onset of the gametogenesis process occurs. Our more precise identification of the photolabile period in September by examining the effects of LL on gonadal maturation and 11-KT levels is in agreement with previous works conducted on prepubertal fish, in which longer LL treatments including the September–October period consistently and significantly decreased 11-KT plasma levels (Rodríguez et al. 2005; Felip et al. 2008).

Despite the general reduction in fish precocity under continuous light in all groups, Trial 1 presented higher rates of precocious fish than Trial 2. This difference can be attributed to the different fish size of the populations; the fish were larger in T1 than in T2 and consequently presented higher rates of precocious fish. This characteristic pattern has been confirmed throughout a series of studies conducted on populations of distinct average size or weight, which presented different rates of precocious fish at the time of maximum spermiation (February). Furthermore, the lineal regression equation for both variables may provide further support for the hypothesis that a low body weight or size could be a limiting factor for the onset of gametogenesis in sea bass.

Previous works have suggested that the first gonadal maturation is an extremely demanding process in terms of energy and only occurs when the virgin fish attain a certain degree of somatic growth or reach an energy reserve threshold (Rowe et al. 1991). Begtashi et al. (2004) have hypothesized that the rate of precocious sea bass is associated with the size and weight the fish attain in November, with reported average values of 107.80 g and 19.35 cm, respectively, for the maximum precocity rate (21.9%).

In the present work, the groups with the lowest numbers of individuals in advanced gonadal stages also registered the lowest 11-KT and GSI values. However, the effectiveness of continuous light on all the parameters studied was

evident in the groups subjected to constant LL, which failed to register spermiating males in any trial. In addition, the percentages of individuals in advanced gonadal stages and 11-KT levels were also lower (2.5% and 0.71 ng/ml in Trial 1 and 0.0% and 0.34 ng/ml in Trial 2) than in the SNP groups (30.43% and 1.05 ng/ml in Trial 1 and 26.1% and 0.98 ng/ml in Trial 2). These results are in agreement with those obtained in sea bass by Begtashi et al. (2004), which showed a greater reduction in precocity under constant light (0.0%) versus SNP (21.9%) during the month of February. In a similar work on sea bass published by Rodríguez et al. (2005), there was evidence that the 11-KT profile for the LL group was very low and remained unchanged throughout the entire spermatogenesis process, while the SNP group showed a peak in 11-KT plasma levels during February (around 5 ng/ml). Another study on sea bass by Felip et al. (2008) evidenced that 4- or 6-month exposures to LL during pregametogenesis and gametogenesis, respectively, produced similar lower rates of precocity (<3%) as compared to fish maintained under LL conditions all year. Similarly, fish exposed to LL registered constant low levels of 11-KT (around 0.5 ng/ml), in contrast to those in the SNP group, which attained values of around 4 ng/ml on these same dates.

The ultimate effect of continuous light on gonadal maturation may be inhibiting the synthesis and release of 11-KT, a hormone that would appear to be essential for the development of all stages of maturation (Miura et al. 1991). This would explain the low levels of this hormone in LL-treated fish, which were always immature. On the other hand, elevated levels of 11-KT have been associated with the initiation of spermiogenesis in males (Rodríguez et al. 2004; Weltzien et al. 2002). Finally, as previously mentioned, there is mounting evidence that the low levels of androgens induced by continuous light may be due to insufficient gonadotropic stimulation. These low levels of androgen would not only reduce the number of spermatogenic cysts recruited during spermatogenesis, they would also potentially increase spermatogonial apoptosis, as has been observed in other species of teleost fish (Almeida et al. 2009). However, this is still pending confirmation and is one of the objectives in our present lines of research.

In conclusion, these results demonstrate the existence of a critical photolabile period for LL exposure in order to reduce precocity in sea bass. An accurate localization of this period suggests that September may be the time for the beginning of gametogenesis in fish kept under natural photoperiod and

temperature conditions, at least at our geographical latitude (40°LN). Furthermore, 11-KT plasma levels would also seem to be a valuable indicator of gonadal maturation in sea bass. The reduction from the 12, 6, or 4 months of continuous light exposure reported in previous works to just 1 or 2 months in the present study, with practically no loss of effectiveness, is extremely important in terms of the welfare of the animals being subjected to LL therapies in order to reduce precocity. Another key advantage of using short LL treatments is the potential reduction in the artificial light needed to suppress maturation.

Acknowledgments

We thank the Histology and Animal Husbandry Service at IATS for Technical Support, especially to Conrado Marín and Joaquín Simó for their assistance in the sample process, Estela Redón Calvillo and Ana Esther Catalán Cots for their assistance in the data analysis. This research was funded by EU project No. Q5R5-2002-01801 (PUBERTIMING); the Spanish Ministry of Science and Education (AGL2006-04672) and CONSOLIDER (CSD2007-002) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO/2010/003). R. R. was supported by a grant of the MICINN.

References

1. Almeida FFL, Taranger GL, Norberg B, Karlsten Ø, Bogerd J, Schulz RW (2009) Photoperiod-modulated testis maturation in Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.). *Biol Reprod* 80:631–640.
2. Bayarri MJ, Zanuy S, Yilmaz O, Carrillo M (2009) Effects of the continuous light on the reproductive system of European sea bass gauged by alterations of circadian variations during their first reproductive cycle. *Chronobiol Int* 26(2):184–199.
3. Begtashi I, Rodríguez L, Molés G, Zanuy S, Carrillo M (2004) Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). I. Morphological aspects. *Aquaculture* 241:539–559.

4. Bromage N, Porter M, Randall C (2001) The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197:63–98.
5. Carrillo M, Zanuy S, Prat F, Cerdá J, Ramos J, Mañanós E, Bromage N (1995) Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: Bromage NR, Roberts RJ (eds) *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell, Oxford, pp 138–168.
6. Carrillo M, Zanuy S, Felip A, Bayarri MJ, Molés G, Gómez A (2009) Hormonal and environmental control of puberty in perciform fish: the case of sea bass. *Trends Comp Endocrinol Neurobiol Ann N Y Acad Sci* 1163:49–59.
7. Carrillo M, Begatashi I, Rodríguez L, Marín MC, Zanuy S (2010) Long photoperiod on sea cages delays timing of first spermiation and enhances growth in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 299:157–164.
8. Davie A, Porter MJR, Bromage NR, Migaud H (2007) The role of seasonally altering photoperiod in regulating physiology in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Part I. Sexual maturation. *Can J Fish Aquat Sci* 64:84–97.
9. Felip A, Zanuy S, Muriach B, Cerdá-Reverter JM, Carrillo M (2008) Reduction of sexual maturation in male *Dicentrarchus labrax* by continuous light both before and during gametogenesis. *Aquaculture* 275:347–355.
10. García-López A, Pascual E, Sarasquete C, Martínez-Rodríguez G (2006) Disruption of gonadal maturation in cultured Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup by continuous light and/or constant temperature regimes. *Aquaculture* 261:789–798.
11. Ginés R, Afonso JM, Argüello A, Zamorano MJ, López JL (2003) Growth in adult gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) as a result of interference in sexual maturation by different photoperiod regimes. *Aquacult Res* 34:73–83.

12. Herland M (1960) Étude critique de deux techniques nouvelles afin de mettre en évidence les différentes catégories cellulaires présente dans la glande pituitaire. *Bull Microsc Appl* 10:37–44.
13. Imsland AK, Dragsnes M, Stefansson SO (2003) Exposure to continuous light inhibits maturation in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 219:911–919.
14. Karlsen Ø, Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL (2006) Effects of photoperiod and exercise on growth, liver size, and age at puberty in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *ICES J Mar Sci* 63:355–364.
15. Longalong FM, Eknath AE, Bentsen HB (1999) Response to bi-directional selection for frequency of early maturing females in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 178:13–25.
16. McClure CA, Hammell KL, Moore M, Dohoo IR, Burnley H (2007) Risk factors for early sexual maturation in Atlantic salmon in seawater farms in New Brunswick and Nova Scotia, Canada. *Aquaculture* 272:370–379.
17. McDowell EM, Trump BF (1976) Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 100:405–414.
18. Migaud H, Fontaine P, Kestemont P, Wang N, Brun-Bellut J (2004) Influence of photoperiod on the onset of gonadogenesis in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquaculture* 241:561–574.
19. Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y (1991) Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc Natl Acad Sci USA* 88:5774–5778.
20. Molés G, Carrillo M, Mañanós E, Mylonas CC, Zanuy S (2007) Temporal profile of brain and pituitary GnRHs, GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Gen Comp Endocrinol* 150:75–86.

21. Nocillado J, Elizur A (2008) Neuroendocrine regulation of puberty in fish: insights from the grey mullet (*Mugil cephalus*) model. *Mol Reprod Dev* 75:355–361.
22. Rocha A, Zanuy A, Carrillo M, Gómez A (2009) Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass. *Gen Comp Endocrinol* 162:265–275.
23. Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M (2000) Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) at puberty. *Fish Physiol Biochem* 23:141–150.
24. Rodríguez L, Zanuy S, Carrillo M (2001) Influence of day length on the age at first maturity and somatic growth in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture* 196:159–175.
25. Rodríguez L, Carrillo M, Sorbera LA, Zohar Y, Zanuy S (2004) Effects of photoperiod on pituitary levels of three forms of GnRH and reproductive hormones in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during testicular differentiation and first testicular recrudescence. *Gen Comp Endocrinol* 136:37–48.
26. Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M (2005) Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). II. Hormonal aspects. *Gen Comp Endocrinol* 140:116–125.
27. Rowe DK, Thorpe JE, Shank AM (1991) Role of fat stores in the maturation of male Atlantic salmon (*Salmo salar*) Parr. *Can J Fish Aquat Sci* 48:405–413.
28. Schulz RW, Miura T (2002) Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol Biochem* 26:43–56.

29. Shewmon LN, Godwin JR, Murashige RS, Daniels HV (2007) Environmental manipulation of growth and sexual maturation in yellow perch, *Perca flavescens*. J World Aquacult Soc 38:383–394.
30. Sokal RR, Rohlf FJ (1981) Biometry, the principles and practice of statistics in biological research, 2nd edn. W.H. Freeman, NY, p 859.
31. Taranger GL, Haux C, Stefansson SO, Björnsson BT, Walther BT, Hansen T (1998) Abrupt changes in photoperiod affect age at maturity, timing of ovulation and plasma testosterone and oestradiol-17 β profiles in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquaculture 162:85–98.
32. Taranger GL, Carrillo M, Schulz RW, Fontaine P, Zanuy S, Felip A, Weltzien F, Dufour S, Karlse O, Norberg B, Andersson E, Hansen T (2010) Control of puberty in farmed fish. Gen Comp Endocrinol 165:483–515.
33. Weltzien FA, Taranger GL, Karlsen Ø, Norberg B (2002) Spermatogenesis and related plasma androgen levels in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Comp Biochem Physiol A 132:567–575.
34. Weltzien F-A, Karlsen Ø, Norberg B (2003) Growth patterns and plasma levels of testosterone, 11-ketotestosterone, and IGF-1 in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) from juvenile stages throughout sexual development. Fish Physiol Biochem 28(1–4):227–228

CAPÍTULO 5
ARTÍCULO 2

ADVANCED PUBERTY TRIGGERED BY BI-WEEKLY CHANGES IN REPRODUCTIVE FACTORS DURING THE PHOTOLABILE PERIOD IN A MALE TELEOST FISH, *Dicentrarchus labrax* L.

Publicado en *General and Comparative Endocrinology* 275 (2019): 82-93

Rafael Rodríguez¹ Alicia Felip¹ Silvia Zanuy¹ and Manuel Carrillo¹

¹Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain.

Introduction

Puberty is a complex biological process in which the brain-pituitary-gonad (BPG) axis acquires functional competence, which results in the ability of an individual to sexually reproduce for the first time (Taranger et al., 2010). In the aquaculture of fin fish species, the occurrence of advanced puberty (precocity or early maturation) is common in males, although it can also affect females (Brown et al., 2014). When this happens, it reduces fish growth before harvest and, consequently, it entails important losses for the aquaculture industry (Felip et al., 2006; Carrillo et al., 2009; Taranger et al., 2010). Several studies have reported that photoperiod is one of the main environmental cues for the control of reproductive maturation in many temperate fish species and seasonal breeders (Carrillo et al., 1993; Bromage et al., 2001; Taranger et al., 2010; Migaud et al., 2010). A vast number of studies have assessed the effect of different photoperiod regimes on fish maturation and growth, and they have reported that some reproductive factors are critical for modulating the reproductive axis in teleosts (Taranger et al., 2010; Carrillo et al., 2015; Espigares et al., 2015a, b, 2017). In the case of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), an economically important marine species and valued fish by consumers, the use of different photoperiod regimes to control male maturation has been widely investigated. While compressed photoperiods have been shown to advance the first sexual maturation (Rodríguez et al., 2001a), these constant long light regimes delay spermatogenesis in this species (Rodríguez et al., 2001b). On the other

hand, exposure to continuous light (LL) lasting for 12 consecutive months (Begtashi et al., 2004) or less before or during gametogenesis (Felip et al., 2008) is equally effective in reducing early maturation in underyearling fish. Along these lines, a photolabile period that includes the month of September has been shown to exist in this teleost fish. The application of LL during this period reduces the number of early maturing males (Rodríguez et al., 2012), although LL has no effect on the gonadal maturation of the animals during the second annual life cycle (Felip et al., 2017). Accordingly, further physiological studies aimed at gaining deeper knowledge of the endocrine regulation of spermatogenesis in sea bass have shown that the temporal profile of both seabream and salmon GnRH forms in the brain and pituitary, as well as the GnRH-R-2A receptor, play an important role during gonadal differentiation and first spermiation in males of this species (Rodríguez et al., 2000a, b; Molés et al., 2007). Furthermore, recent data have revealed that photoperiod signalling modulates the expression of *kiss1* and chicken *gnrh* in the brain, which may be involved in the translation of environmental stimuli to trigger the reproductive axis (Espigares et al., 2017). Moreover, plasma follicle-stimulating hormone (Fsh) levels increase during sex differentiation and testicular growth, but they decrease just before the start of full spermiation. Circulating luteinizing hormone (Lh) levels, on the other hand, show a moderate increase during spermatogenesis, with a significant elevation from late gonadal recrudescence onwards (Molés et al., 2007). Male sea bass under different photoperiods exhibit shifts in hormone profiles that are crucial for gonadal maturation. In fact, LL regimes affect both the follicle-stimulating hormone beta subunit (*fshβ*) expression and 11-ketotestosterone (11-KT) plasma levels in prepubertal fish (Felip et al., 2008). These results are in agreement with recent studies on this same species (Espigares et al., 2017) suggesting that the unbalanced production of this androgen, which is regulated by Fsh (Mazón et al., 2014), might be limiting the stimulation of germ cell proliferation at the testicular level. In zebrafish (*Danio rerio*), Fsh stimulates spermatogonial proliferation and differentiation regulating a stimulatory factor, namely the insulin-like growth factor type 3 (*Igf3*) (Nóbrega et al., 2015). Also in adult zebrafish, Fsh down-regulates testicular anti-müllerian hormone (*amh*) expression, and mitigates the inhibitory effects of Amh on spermatogenesis and steroidogenesis (Skaar et al., 2011). However, other experiments have shown that *amh* is involved in the maintenance of mitotic proliferation of germ cells during early sex differentiation in medaka (*Oryzias*

latipes) (Shiraishi et al., 2007; Morinaga et al., 2007) and black porgy (*Acanthopagrus schelegeli*) (Wu et al., 2010), although it apparently represses the proliferation of steroidogenic cells in prepubertal testes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Maugars and Schmitz, 2008), which demonstrates that amh can exhibit multiple regulatory functions in fish gonadal development. Along these lines, the role of other genes involved in the control of spermatogenesis has also been explored. In Atlantic cod (*Gadus morhua*), for example, changes in the mRNA levels of steroidogenic acute regulatory protein (star) have shown a direct relationship with changes in 11-KT levels (Kortner et al., 2008). Sea bass Amh (Halm et al., 2007) and Star (Rocha et al., 2009) may play important roles in testicular development, although their relationship to steroid production and expression of estrogen receptor (er) genes on prepubertal fish is unknown. A number of studies have shown the existence in fish of predictive mechanisms that use photoperiod as a proximal factor for the recruitment of individuals into gonadogenesis. Continuous artificial lighting tricks the fish, which fail to maintain the circadian variations in certain reproductive hormones that are necessary for the normal process of reproduction (Falcón et al., 2010). Here we report on bi-weekly changes in the expression of fsh β , amh, star and er, brain content of GnRH forms and circulating levels of sex steroids and gonadotropins in males maintained under LL conditions throughout the photosensitive period, in order to decipher a possible mechanism of endocrine control over maturity during early gametogenesis in this teleost fish.

Materials and methods

Animals and photoperiodic regimes

A total of 1500 juvenile fish with a high percentage of males were obtained from Aquanord (Gravelines, France). Fish with an average weight of 4.0 g were distributed in six 2000-l lightproof circular fiberglass tanks (n = 250 fish/tank). Sex-ratio (100% males) was confirmed by histological examination throughout the experiment at each sampling interval. In May, three experimental groups were organized in duplicate as follows: simulated natural photoperiod (NP), constant continuous light (LL) from August 15 to September 15

(LLa/s for 1 month) under otherwise NP conditions, and constant continuous light all the year round (LLy). Artificial continuous light regimes were applied using tungsten lightbulbs (650–700 lx; Philips, PAR38Pro), controlled by means of electronic clocks, and located at the water surface of each tank. Temperature naturally ranged between 12 and 25 ± 1 °C. Fish were fed to apparent satiety, using automatic feeders with pellets from Proaqua Nutrición, S.A. (Palencia, Spain) (protein 54–45%, lipids 20–12%, carbohydrates 9–25%, ash 11%, moisture 1–3%, and DE 22.4 19.7 MJ kg⁻¹), according to temperature and fish size, and using standard procedures (Barnabé, 1995).

Growth, gonadal maturation and sample collection

Animals were treated according to the guidelines for animal experiments set out in European legislation (ETS No. 123, 01/01/91). Fish were anaesthetised with 2-phenoxyethanol (0.5 ml l⁻¹ of seawater) before sampling. All fish from each tank were periodically weighed (body weight, BW) and measured (fork length, FL), and their condition factor was calculated as $100 \times \text{BW} / \text{FL}^3$. The percentage of early maturing males was periodically assessed by abdominal massage from December to April. Twenty fish per photoperiod regime ($n = 10$ fish/replicate) were sacrificed by a quick cut at the level of the medulla oblongata every fifteen days from August 1 to October 15, during early gametogenesis. The gonads were quickly removed and weighed to determine the gonadosomatic index (GSI), according to the formula: $\text{GW (g)} / \text{BW (g)} \times 100$, where GW = gonad weight. Fragments of testes were frozen on dry ice and stored at -80 °C until later use for total RNA extraction. Small pieces of testes were also fixed in 4% formaldehyde: 1% glutaraldehyde buffered saline for histological analysis (Bennett et al., 1976; McDowell and Trump, 1976). The stages of testicular development were assessed according to the procedure described by Begtashi et al. (2004). Stages I (immature) and IV (late recrudescence) were taken as indicators of sexual maturation, as one of their distinctive characteristics in the presence of spermatogonia and spermatozooids, respectively. The number of mitotic cell divisions of spermatogonia A was evaluated at 50x magnification in twelve optical areas (2500 μm^2) per fish, according to the method described by Escobar et al. (2014) for taking cell counts in histological samples.

Hormonal analyses

Blood samples were collected from the caudal vein using 1-ml heparinized syringes; these were then transferred to 0.5-ml Eppendorf tubes treated with heparin and placed on ice. Tubes were subsequently centrifuged at 3000 rpm for 30 min at 4 °C. The plasma was stored at -20 °C until it was analyzed for certain reproductive hormones, using validated enzyme immunoassays (EIA) (Kah et al., 1994; Holland et al., 1998; Rodríguez et al., 2000a, 2001a; Molés et al., 2008, 2012). Bi-weekly changes in the circulating levels of certain reproductive hormones were analyzed from August 1 to October 15, during early gametogenesis. Plasmatic levels were determined according to Rodríguez et al. (2000a) for testosterone (T), Rodríguez et al. (2001a) for 11-ketotestosterone (11-KT), Molés et al. (2008) for oestradiol-17 β (E2) and Molés et al. (2012) for Fsh. Similarly, the content in the brain of three forms of gonadotropin-releasing hormones was measured according to Holland et al. (1998) for seabream (Gnrh1) and chicken (Gnrh2) GnRH, and Kah et al. (1994) for salmon GnRH (Gnrh3).

Relative expression of fsh β in the pituitary and amh, star, er β 1 and er β 2 in the gonad by quantitative real-time PCR

A total of 20 pituitaries per treatment were analyzed at every sampling point in each group for fsh β , using a real-time qPCR approach as described by Felip et al. (2008). The gene expression in the extracted gonads was quantified according to Crespo et al. (2013) for anti-Müllerian hormone (amh), Rocha et al. (2009) for the steroidogenic acute regulatory (star) protein, and Blázquez et al. (2008) for estrogen receptors (er β 1 and er β 2) (**Table 5.1**). To this end, pooled gonad samples (2 gonads/pool) were prepared from fish exhibiting similar plasma levels of 11-KT as an indicator of the maturation stage in juvenile male sea bass (Rodríguez et al., 2012). A total number of 6–10 pools per treatment were analyzed at every sampling point in each group. Total RNA was prepared using TRI-REAGENT solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) and each sample was DNase-treated (RQ1 RNase-Free DNase, Promega, Madison, WI, USA) prior to the reverse-transcription procedure. The RNA samples were resuspended in 5 or 20 μ l of DEPC water for pituitaries and gonads, respectively. We ran 1 μ l of total RNA through a 0.8% agarose gel and used a 0.24–9.5 Kb RNA ladder (Invitrogen, Life Technologies) for quantification by densitometry, using image analysis software (Densitometer GS-710 and Quantity One Software, BioRad). A total volume of 20 μ l of reaction, including 2 μ g

of total RNA and random hexamer primers, was used for reverse-transcription reactions (SuperScript II Reverse Transcriptase, Invitrogen, Life Technologies). The PCR mixture consisted of 1 μ l of cDNA sample in a final volume of 25 μ l, except in the case of 18S rRNA and fsh β , in which the template was 1 μ l of a 1:500 dilution. The qRT-PCR was performed using Mastermix for Syber Green I (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG, Invitrogen, Life Technologies) or Absolute qPCR Mix (ABgene, UK) for TaqMan probe-based assays. The amount of primer or TaqMan fluorogenic probe, when necessary, in the PCR reactions of each gene is detailed in **Table 5.1**. The thermocycling conditions for SYBER Green analyses were as follows: initial denaturation at 95 °C for 3 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 sec and annealing-extension at 60 °C for 1 min. A melt-curve analysis was run after each real-time experiment for each gene, thus evidencing the specificity of the real time qPCR. For TaqMan probe-based assays, the thermocycling conditions were: 95 °C for 15 min, 40 cycles of 95 °C for 15 sec and 60 °C for 1 min. All amplifications were carried out in an iQCyler iQ Multi-Color Real Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), using 96-well plates (Abgene, UK). The data were analyzed with the iCycler IQ Optical System Software (Version 3.0a) provided by the manufacturer. All transcripts were quantified using standard curves for each gene analyzed, which were generated by a 10-fold serial dilution of known concentrations of the plasmid containing the target transcripts. PCR efficiency was calculated for each gene in each real-time PCR experiment (**Table 5.1**). All standards and experimental samples were run in duplicate. The mRNA levels were normalized to the amount of sea bass 18S rRNA. Data were expressed as relative values of mRNA of each target gene/mRNA 18S rRNA (starting quantity mean \pm the standard error of the mean, SEM). Negative controls were also run for each real-time experiment.

Statistical analysis

A two-way ANOVA test was used to compare the effects of the three photoperiodic regimes on growth and reproductive performance, including biometric parameters, number of mitotic cell divisions of spermatogonia A, hormonal analyses and relative gene expression of juvenile male sea bass at different sampling times during early gametogenesis. When necessary, normality was assessed by applying the Kolmogorov–Smirnov test after the logarithmic transformation of data. Barlett's test was used to establish homogeneity of

variances. A Tukey HSD multiple range test was used to examine significant differences between means. Nominal data of the percentage of early maturing fish versus immature fish under the three photoperiodic regimes was calculated by using the Chi-Square statistic and applying the Yates correction when $v = 1$, or Bonferroni inequality for P values when performing a multiple test. All data were expressed as the mean \pm SEM. Differences were accepted as significant when $P < 0.05$ (Sokal and Rohlf, 1981).

Tabla 5.1. Gene-specific primers and Taqman and SybGreen fluorogenic probes, when necessary, used in this study for qRT-PCR analysis.

Gen	Detection method	5' to 3' sequence	Size (bp) ^b	nM ^c	Efficiency (%) ^d
18S rRNA (AM419038) ^e (Felip et al., 2008)	SYBR Green based	^f F: GCATGCCGGAGTCTCGTT ^g R: TGCATGGCCGTTCTTAGTTG	70	200 200	103
<i>fshβ</i> (AF543314) (Felip et al., 2008)	SYBR Green based	F: TCGATAGTACGTGTCTGTGCT R: CACTTGGATGCTGATGTTGG	131	200 200	99
<i>erβ1</i> (AJ489523) (Blázquez et al., 2008)	SYBR Green based	F: CTGTCCTCACAGAGTAGAACAC R: GCAGGTGCACCTGGTCCAAG	295	200 200	99
<i>erβ2</i> (AJ489524) (Blázquez et al., 2008)	SYBR Green based	F: GTGGACTCCAGACTCGGGAC R: ATCATGCTAGCCTCGGTGAAG	246	200 200	98
<i>amh</i> (AM232701) (Crespo et al., 2013)	Probed based	F: TCCAAACACTGCTAACATCAACAA R: TGGCGTGGTTCTTGGGATT ^h pr:[6~FAM]CCATGGCTCATGTGCT TTCCCCCT[TAMRA]	74	50 300 125	90

Tabla 5.1. Continued.

<i>star</i> (EF409994) (Rocha et al., 2009)	Probed based	F: GGCTGGATCCCGAAGACAA R: CCTGAGGTGGTTGGCAAAGT pr:[6~FAM]CATAAACAAAGTGCTCT CTCAGACGCAGGTG[TAMRA]	72	900 900 75	98
---	--------------	---	----	------------------	----

^aPrimer were obtained from Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA) and fluorogenic probes were purchased from Operon Biotechnologies GmbH (Cologne, Germany). ^bFragment size, ^cAmount of primer or probe in the PCR. ^dPCR efficiency, ^eGenBank accession number for sea bass genes. ^fF: forward primer; ^gR: reverse primer; ^hpr: Taqman fluorogenic probe.

Results

Growth and male maturation

Differences in growth performance between fish under NP and LL conditions were found (**Fig. 5.1**). Mean weight of fish under NP gradually increased from 15.29 ± 0.20 g in August to 96.35 ± 1.54 g in December, whereas their length increased from 10.31 ± 0.05 cm to 18.40 ± 0.1 cm during the same period of time. The mean weight of fish under LLa/s was approximately 12.42% lower than that of those kept under NP, and 10.87% lower than that of the LLy treatment in the month of December. Meanwhile, the fish mean length under LLa/s was approximately 2% shorter than that under NP and 1.9% shorter than those kept under LLy for the same period of time. The mean weight and length values of fish under LLy conditions were approximately 1.81% and 0.22% lower, as compared to the control group. The condition factor varied between 1.38 and 1.52 in fish under NP, while it was around 1.24–1.42 in the LLa/s group. Fish under LLy exhibited condition factor values ranging from 1.24 to 1.51. The mean condition factor of fish under LLy was approximately 5.9% higher than under LLa/s in December. Of note, the mean condition factor values for fish under LLy were 0.66% lower than those of the NP group, while significant differences were observed in the LLa/s for the same period of time (**Fig. 5.1**). The percentages of gonadal stage I (**Fig. 5.2A**), II (**Fig. 5.2B**) and III (**Fig. 5.2C**) run roughly parallel in the LL groups. Of note, the percentage value of gonadal stage I (immature) in the LL groups varied in the range of 50–73.33% in the LLa/s group and 21.43–63.64% in the LLy group during the winter (January-March). Meanwhile, the NP group registered low values that varied from around 0 to 46.15% throughout this period.

On the other hand, the percentages of gonadal stage IV (late recrudescence) (**Fig. 5.2D**) for the NP group peaked in March (36.36%), while the other groups presented very low values (0%). We also observed that the relative spermiation rate in the NP group (100%) was significantly higher than that observed in the LLa/s (46.5%) and LLy (0%) groups (**Fig. 5.2E**), although GSI values were comparable among the groups in February (0.04%), and no significant differences were observed.

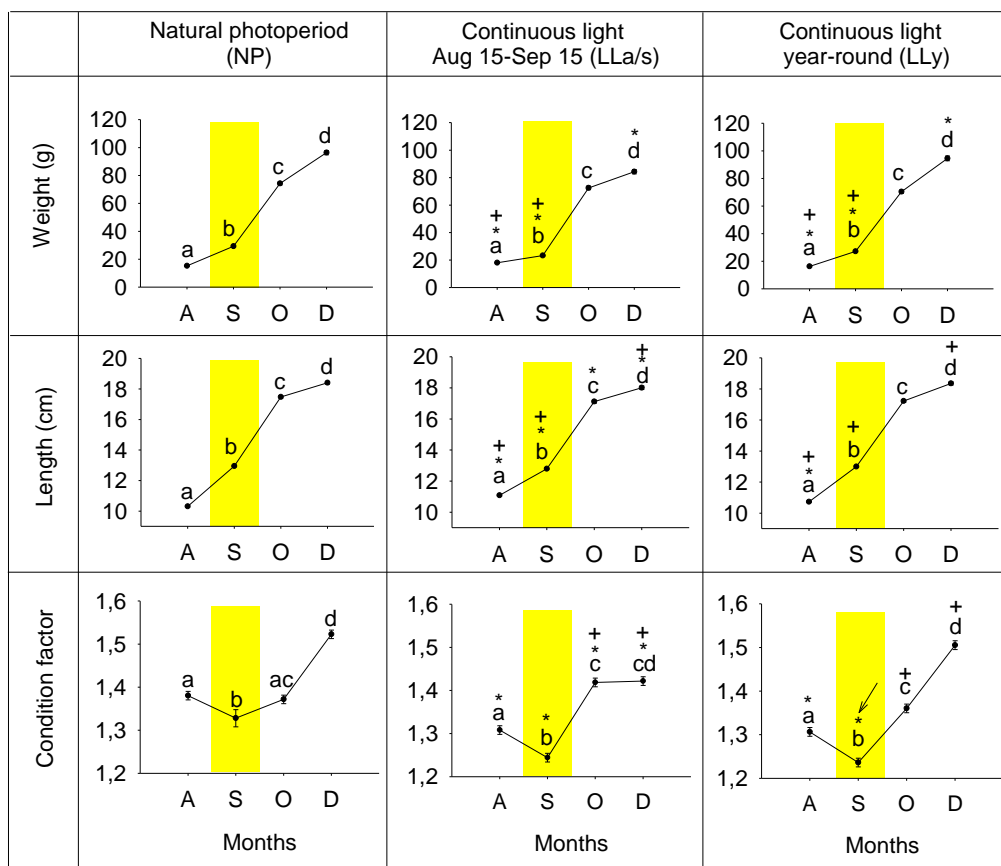


Figura 5.1. Evolution of somatic growth and condition factor (FC) in juvenile male sea bass kept under a natural photoperiod (NP), continuous light (LL) from August 15 to September 15 under otherwise NP conditions (LLa/s), and LL year-round (LLy). Asterisks (*) by either LLa/s or LLy groups indicate significant differences ($P < 0.05$) for the corresponding dates of the NP group. Positive symbols (+) indicate significant differences ($P < 0.05$) between the LLy group and the LLa/s group for the same date. Arrows indicate the first significant decrease in the values with respect to either the NP group on the same date or the previous values of the same group. Abbreviations: A, August; S, September; O, October, D, December.

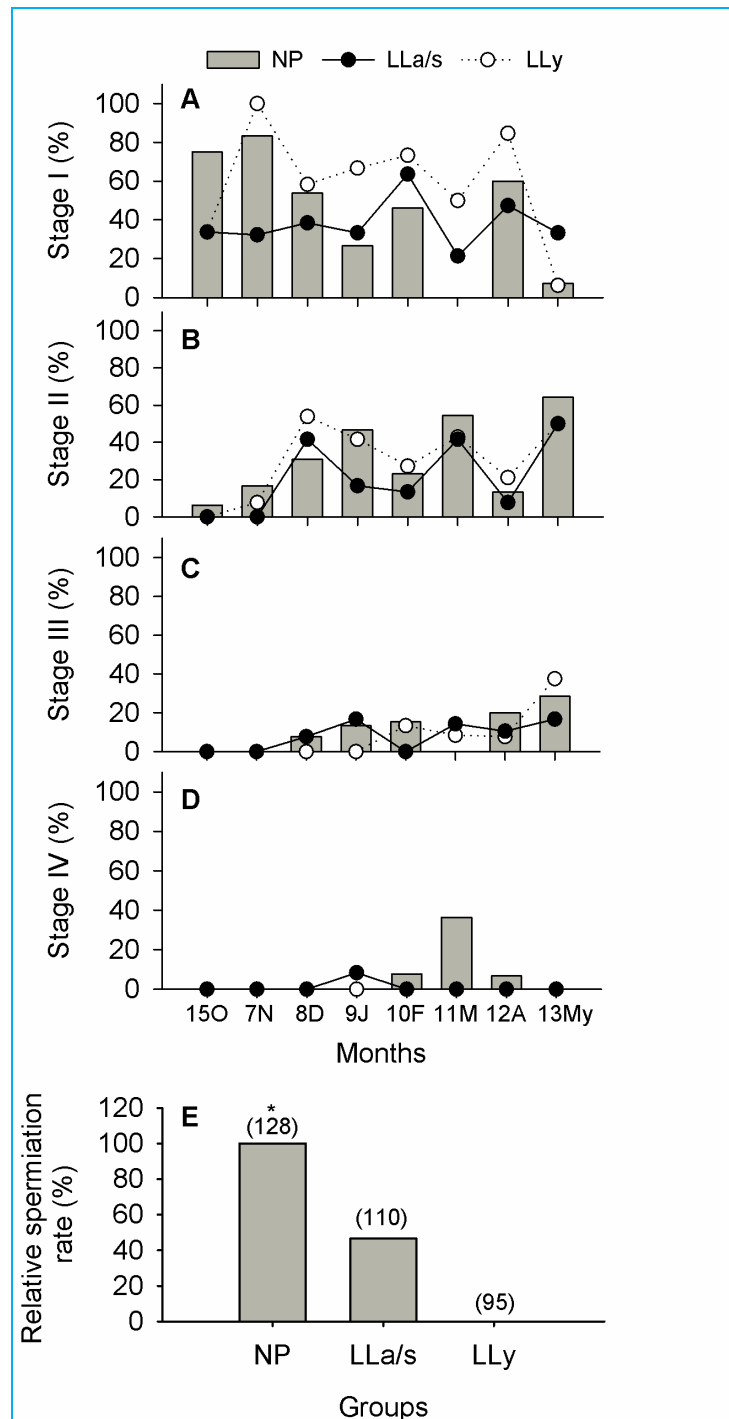


Figura 5.2. Evolution of testicular development in juvenile male sea bass kept under a natural photoperiod (NP, solid bars), continuous light (LL) from August 15 to September 15 under otherwise NP conditions (LLa/s, solid lines and closed circles) and LL year-round (LLy, broken lines and open circles). Evolution is shown in percentages of gonadal stage I (immature) (A), II (B), III (C) and IV (late recrudescence) (D) throughout the first year of life of the fish, following previously established histological criteria (Begtashi et al., 2004). (E) Cumulative rates of spermiation (assessed by abdominal massage) per experimental group are expressed as relative spermiation rate. Numbers in brackets indicate the number of fish counted. Asterisks (*) indicate significant differences ($P < 0.05$) in the NP group with respect to LLa/s and LLy groups. Abbreviations: O, October; N, November; D, December; J, January; F, February; M, March; A, April; My, May.

Seasonal changes in the content of three forms of GnRH in the brain and fsh β expression levels in the pituitary

While GnRH1 levels in the NP group ranged from 0.68 to 2.39 ng/ml during the early gametogenesis (August-mid October), we observed a significant decrease in GnRH1 levels in the LLa/s (0.59 ± 0.09 ng/ml) and LLy (1.15 ± 0.08 ng/ml) groups, as compared to those in the NP group (1.34 ± 0.15 ng/ml) in early September (**Fig. 5.3** top panel). On the other hand, GnRH2 levels in the NP group remained unchanged throughout the mid-August and early October period (1.94–2.47 ng/ml); this contrasted with the findings for the LL groups, which showed a steady decrease from mid-September onwards, resulting in GnRH2 levels of less than 1.36 ± 0.14 ng/ml for the LLa/s group and 2.03 ± 0.22 ng/ml for the LLy group (**Fig. 5.3**, middle panel). Finally, the levels of GnRH3 reached during mid-September were unaffected by the photoperiod regimes, showing values of 0.93 ± 0.09 , 0.90 ± 0.07 and 0.87 ± 0.07 ng/ml for the NP, LLa/s and LLy groups, respectively (**Fig. 5.3**, bottom panel). fsh β expression in the pituitary (**Fig. 5.4**, top panel) increased significantly in the NP group during mid-September and declined thereafter. In contrast, the expression levels of fsh β remained low and unchanged in LLa/s and LLy groups throughout this period of early gametogenesis.

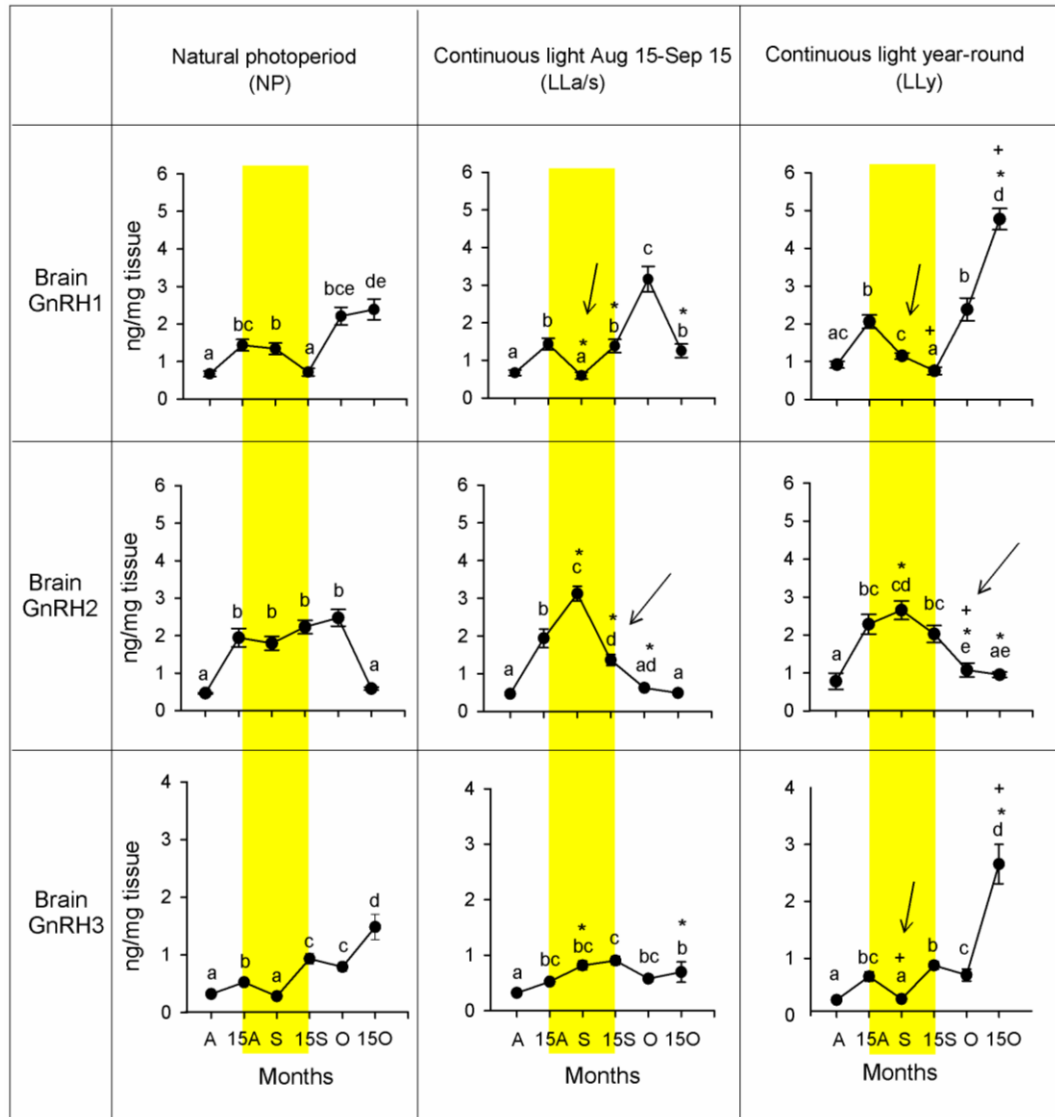


Figure 5.3. Brain seabream (GnRH1), chicken-II (GnRH2) and salmon (GnRH3) GnRH content in juvenile male sea bass, kept under a natural photoperiod (NP), continuous light (LL) from August 15 to September 15 under otherwise NP conditions (LLa/s) and LL year-round (LLy), and sampled during their first year of life. Different letters represent significant differences between months ($P < 0.05$) for a given variable. Asterisks (*) by either LLa/s or LLy groups indicate significant differences ($P < 0.05$) for the corresponding dates of the NP group. Positive symbols (+) indicate significant differences ($P < 0.05$) of the LLy group with respect to the LLa/s group for the same date. Arrows indicate the first significant decrease in the values with respect to either the NP group on the same date or to the previous value of the same group. Abbreviations: A, August; S, September; O, October.

Seasonal changes in amh, star, erβ1 and erβ2 expression levels in the gonad and evolution of spermatogonial mitoses in males

In the NP group, amh expression significantly decreased in early September (**Fig. 5.4**, middle panel), concomitantly with the increase in the number of spermatogonial mitoses (9 mitoses/mm²) (**Fig. 5.4**, bottom panel) and the increased expression of fshβ in the pituitary (**Fig. 5.4**, top panel). amh expression was low ($P < 0.05$) during early and mid-September, with a slight and significant increase in October that coincided with a significantly lower number of spermatogonial mitoses (1.67 mitoses/mm²) and fshβ mRNA levels. On the other hand, exposure to different LL treatments evoked a slight, but not significant decrease in amh mRNA from early August to mid-September/early October, proceeding to further increase thereafter. Neither of the LL groups exhibited any differences in the number of mitoses of spermatogonial cells and fshβ mRNA levels, which remained low and constant during this entire period (**Fig. 5.4**, top panel). In the case of the LLa/s group, the number of spermatogonial mitoses peaked during early October (7.83 mitoses/mm²), and then decreased during mid-October (4.17 mitoses/mm²), although to levels not statistically different from the previous period. The number of spermatogonial mitoses in the LLy group ranged from 1.7 to 3.6 from September onwards. As observed in amh expression, changes in star mRNA significantly decreased during early and mid-September, to further increase in October, although to levels similar to those observed in August in the NP group (**Fig. 5.5**, top panel). The LLa/s group showed a gradual decrease in star mRNA from early August to mid-September, and then increased in October to values similar to those observed in August. star mRNA levels in the LLa/s group were significantly higher than those observed in the NP group. Meanwhile, star expression significantly decreased in the LLy group, and these low levels were maintained until the end of the early gametogenesis. On the other hand, erβ1 and erβ2 gonadal expression profiles throughout early gametogenesis among the three experimental groups were apparently not affected by light regimes (**Fig. 5.5**, middle-bottom panels).

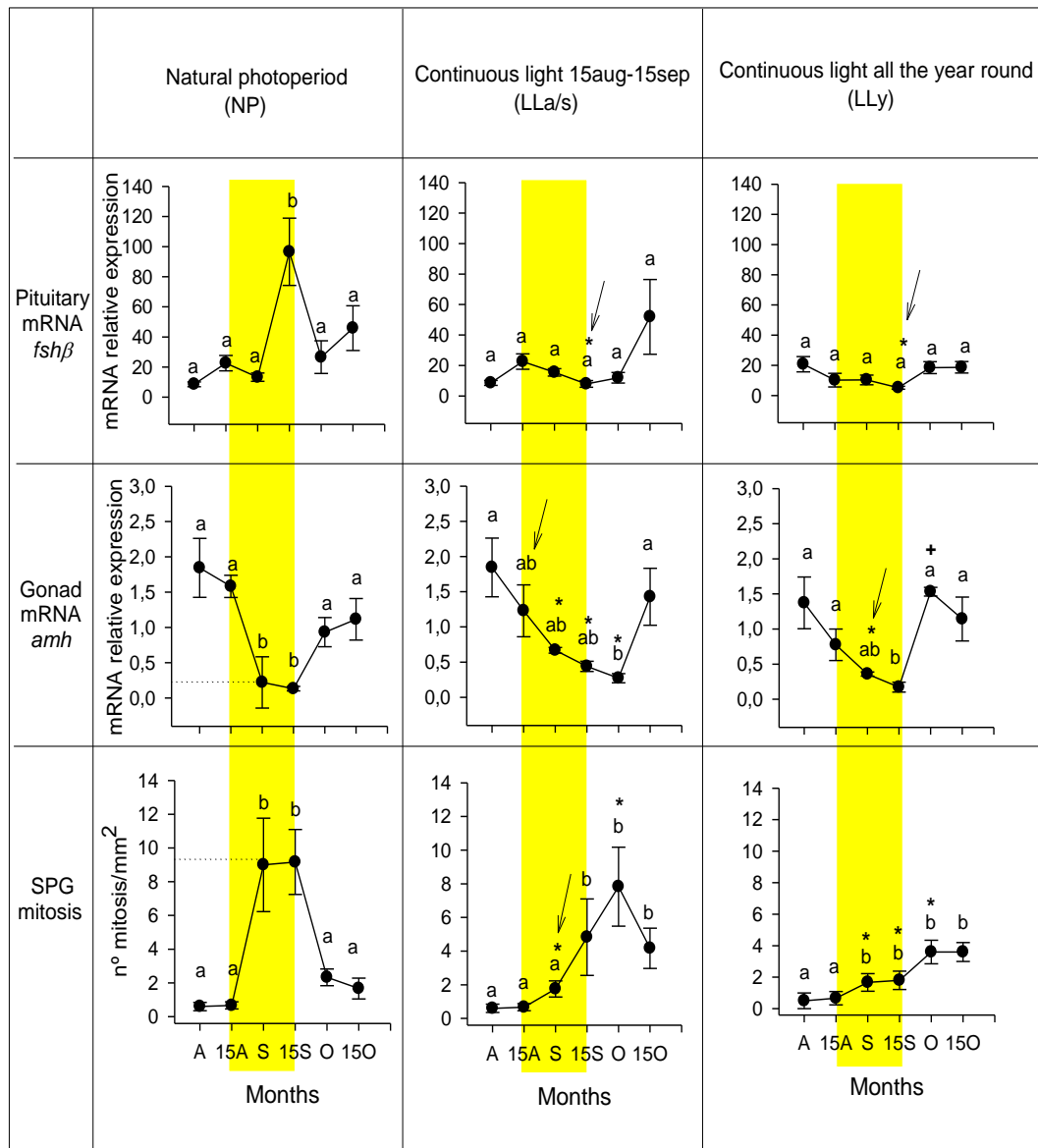


Figure 5.4. Evolution of *fshβ* and *amh* expression and mitotic index of spermatogonia type A (SPGA) at early gametogenesis in juvenile male sea bass, kept under a natural photoperiod (NP), continuous light (LL) from August 15 to September 15 under otherwise NP conditions (LLa/s) and LL year-round (LLy). Relative changes in expression of *fshβ* in the pituitary and *amh* in the gonad of fish sampled during their first year of life. All expression values are normalized to 18S rRNA. Changes in the mitotic index of SPGA in fish sampled during their first year of life. Different letters represent differences between months ($P < 0.05$) for a given variable. Asterisks (*) by either LLa/s or LLy groups indicate significant differences ($P < 0.05$) for the corresponding dates of the NP group. Positive symbols (+) indicate significant differences ($P < 0.05$) in the LLy group with respect to the LLa/s group for a same date. Arrows indicate the first significant decrease in the values with respect to either the NP group on the same date or to the previous value for the same group. Abbreviations: A, August; S, September; O, October.

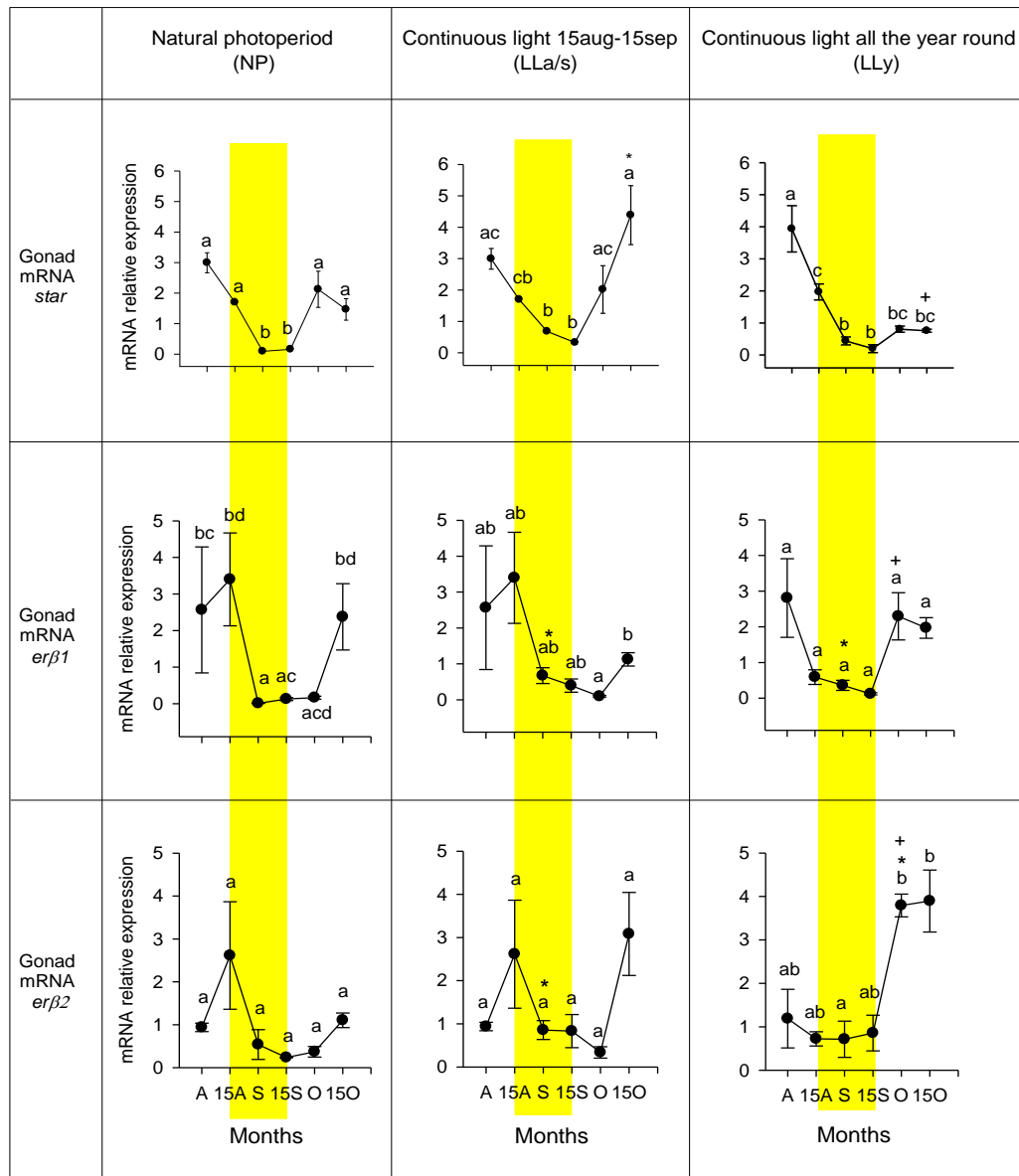


Figura 5.5. Relative changes in the expression of *star*, *erβ1* and *erβ2* in the gonad of juvenile male sea bass, kept under a natural photoperiod (NP), continuous light (LL) from August 15 to September 15 under otherwise NP conditions (LLa/s) and LL year-round (LLy), and sampled during their first year of life. Different letters represent significant differences between months ($P < 0.05$) for a given variable. Asterisks (*) by either LLa/s or LLy groups indicate significant differences ($P < 0.05$) for the corresponding dates of the NP group. Positive symbols (+) indicate significant differences ($P < 0.05$) in the LLy group with respect to the LLa/s group for the same date. Abbreviations: A, August; S, September; O, October.

Seasonal changes in hormonal plasma levels

The E2 levels in the NP group displayed high levels from August to September (up to 1.16 ± 0.10 ng/ml), with a slight decrease thereafter. Interestingly, E2 levels in the LL groups were significantly lower than those of the NP group in early September, with values of 0.49 ± 0.04 ng/ml in the LLa/s group and 0.51 ± 0.05 ng/ml in the LLy group (**Fig. 5.6**, top panel). On the other hand, both plasma 11-KT (around 1.0 ± 0.1 ng/ml) and T (around 4.04 ± 0.37 ng/ml) showed constant levels throughout the August 15 to September 15 period in the NP group (**Fig. 5.6**, middle panel), whereas these values were affected by the LL treatment. In the LLa/s group, average values of plasma 11-KT were around 0.59 ± 0.04 ng/ml during mid-September and decreased to levels that were not statistically significant in October. At the same time, levels of T were around 1.88 ± 0.37 ng/ml during mid-September and decreased to levels significantly lower than the previous period during this time interval. In the LLy group, we observed that plasma 11-KT levels (around 0.57 ng/ml) never reached the high levels of the NP group, while the average values of plasma T were around 2.62 ng/ml, with maximum levels of 3.79 ± 0.38 ng/ml in early September. Finally, the NP group Fsh levels showed a significant increase at the beginning of September (24.58 ± 1.94 ng/ml). The levels progressively increased thereafter, and peaked in October (44.25 ± 2.04 ng/ml). For this same period, Fsh levels in LLa/s increased somewhat later, during mid-September, and were maintained throughout mid-October, with values around 36.54 ± 1.72 ng/ml. In the LLy group, the increase in Fsh was comparable to that in the NP group, appearing in early October (47.33 ± 3.16 ng/ml) (**Fig. 5.6**, bottom panel).

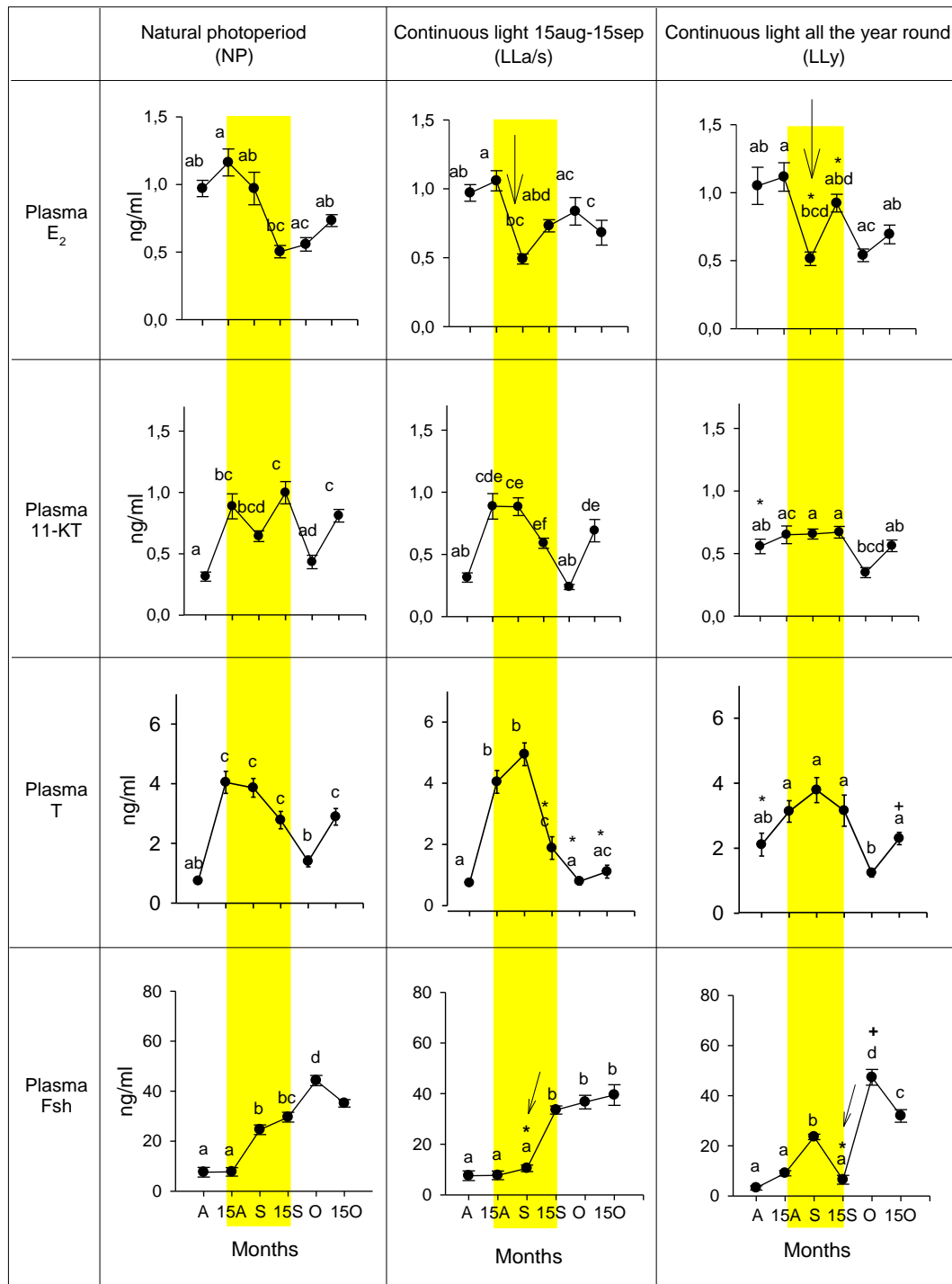


Figura 5.6. Changes in plasma levels of E₂, 11-KT, T and Fsh in juvenile male sea bass, kept under a natural photoperiod (NP), continuous light (LL) from August 15 to September 15 under otherwise NP conditions (LLa/s) and LL year-round (LLy) and sampled during their first year of life. Different letters represent significant differences between months ($P < 0.05$) for a given variable. Asterisks (*) by either LLa/s or LLy groups indicate significant differences ($P < 0.05$) for the corresponding dates of the NP group. Positive symbols (+) indicate significant differences ($P < 0.05$) in the LLy group with respect to the LLa/s group for the same date. Arrows indicate the first significant decrease in the values with respect to either the NP group on the same date or to the previous value of the same group. Abbreviations: A, August; S, September; O, October.

Discussion

This work demonstrates how the bi-weekly changes in some reproductive factors may be altered by the application of continuous light within the photolabile period, leading to disturbances in the testicular development of European sea bass, which in turn results in a clear reduction in the numbers of precocious males. The present results provide further support for the photoperiod as an external cue to which organisms have been adapted (Falcón et al., 2010), and consequently, the alteration of the lighting regime within the boundaries of the photolabile period impacts reproduction. In juvenile male sea bass, exposure to LL affected the rhythmicity of the hormone and gene profiles in a different way, inhibiting seasonal patterns or significantly decreasing their amplitude. Although differences in the intensity of the impact on reproductive factors were observed (**Fig. 5.7**), this gives us an early glimpse into the endocrine control of the early events of gametogenesis in a teleost fish. The fact that the growth performance of juvenile males was different between LL and NP fish agrees with previous studies on this species (Begtashi et al., 2004; Felip et al., 2017), although the work of Felip et al. (2008) showed no differences among treatments. It is interesting to note that LL fish exhibited lower condition factor values than their counterparts, and this was concomitant with reduced gonadal development in less corpulent fish. In other relevant species, LL treatment has been demonstrated to have a stimulatory effect on somatic fish growth (Kashyap et al., 2015; Navarro et al., 2015; Biswas et al., 2016; Veras et al., 2016; Imsland et al., 2018), most likely by stimulating the animals' feed intake and/or food conversion efficiency (Boeuf and Le bail, 1999) or by modulating some hormones that may contribute to the changes in food intake and growth rate in fish (Volkoff et al., 2010). However, in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) continuous light caused a suppression in growth performance (Imsland et al., 1995; Stefánsson et al., 2002). It is possible that fish under LL regimes may require greater quantities of feed to maintain basic metabolic processes, as they are more active and stressed under these environmental conditions (Stefánsson et al., 2002). It is even possible that temperature variations might alter the impact of light on fish growth (Imsland et al., 1995; Jonassen et al., 2000; Døskeland et al., 2016). In addition, it has been observed that central injection of GnRH2 has an inhibitory effect on food intake in goldfish (*Carassius auratus*), which is mediated in part by inhibition of the hypothalamic orexin system that regulates appetite in fish (Hoskins et al., 2008;

Matsuda et al., 2008). In European sea bass, *Gnrh2* is known to stimulate melatonin (Servili et al., 2010), which exhibits an inhibitory effect on food intake and affects somatic growth in this marine teleost (Rubio et al., 2004; Alvarado et al., 2015). It is also worthy to note that *Gnrh1* enhances *fsh β* gene expression during gonadal differentiation of sea bass, thus suggesting that the brain's GnRH system may trigger both sex differentiation and the onset of puberty in this fish (Molés et al., 2007). In fact, a moderate *Gnrh1* and *Gnrh2* pituitary content has been observed at the onset of puberty in male sea bass (Rodríguez et al., 2000b). Data collected in the present study show that the *Gnrh1* content in fish exposed to LL during the photosensitive period was lower than that of the NP fish during early gametogenesis (September). This suggests that low levels of this hormone in a critical period may block the hormonal regulation of the reproductive axis. Furthermore, NP fish showed a constant *Gnrh2* content during the early phases of gametogenesis, in contrast to the presence of a *Gnrh2* peak in LL fish in September, which was followed by a decrease afterwards. All these data suggest that both *Gnrh1* and *Gnrh2* are essential hormonal factors for the onset and progression of spermatogenesis in sea bass, and their disturbances are most likely the reason why individual fish lack functional competence to launch spermiogenesis. Interestingly, a lack of correlation of the hypophysiotropic *Gnrh* forms, *Gnrh1* and *Gnrh2*, with those of *Fsh* plasma levels should be contextualized in light of the European sea bass mode of gonadal development. Sea bass is a group-synchronous spawner and *Gnrh* levels might indicate the parallel maintenance of spermatogenesis in several batches of gametes present in the testes of this species (Carrillo et al., 1993). In goldfish, continuous light induces variations in both *Gnrh* forms and kisspeptin 1, a neuroendocrine factor regulating GnRH secretion in the hypothalamus, demonstrating that photoperiod regulates sex maturation by GnRH and Kiss1 in the brain of this species (Shin et al., 2014). Recent studies in sea bass have indicated that LL downregulates *gnrh1* and *kiss2* (Martins et al., 2015) and that this photoperiod modulates the expression of *kiss1* and *gnrh2* in the midbrain-forebrain, affecting normal testicular development during the onset of puberty (Espigares et al., 2017). These findings suggest that both kisspeptin and *gnrh* systems are involved in the translation of the light stimulus to activate the reproductive axis of this marine teleost fish. In addition, their co-regulation has clear effects on *fsh β* transcription at the pituitary level during early spermatogenesis, thus modulating the onset and

progression of the entire gametogenesis process (Alvarado et al., 2015). In this sense, it has been well established that long-term exposure to LL regimes diminishes *fsh β* expression (Rodríguez et al., 2005; Felip et al., 2008), and a strong reduction in *fsh β* expression and low plasmatic levels have been also found in the LLa/s and LLy groups in this study, thus supporting the importance of photoperiod signalling in the activation of the reproductive axis. These results reinforce the role that Fsh play in the regulation of early-mid phases of spermatogenesis in sea bass, where Lh would be more involved with later stages of gonadal development (measurements not included in this study) (Rodríguez et al., 2000b; Mateos et al., 2003). On the other hand, it is also accepted that piscine gonadotropins are steroidogenic (Planas and Swanson, 2008), and their main function during fish spermatogenesis is the stimulation and production of steroids (Schulz et al., 2010). Nevertheless, it has been observed that gonadotropins show different potencies and responses which could be based on the spermatogenic stage, and therefore in the presence of their corresponding receptors (Mazón et al., 2015). In vitro tissue culture of adult sea bass testis, Lh was more potent than Fsh in stimulating 11-KT production in late spermatogenesis, however, administration of Fsh in vivo in juvenile males of this species caused a significant increase of 11-KT and initiated germ cell proliferation and spermatogenesis (Mazón et al., 2014). In fact, this androgen has been proposed as a possible trigger for the onset of puberty in sea bass (Rodríguez et al., 2005), suggesting that the unbalanced production of 11-KT regulated by *fsh β* might be limiting the stimulation of germ cell proliferation at the testicular level, and hence the onset and progression of gametogenesis in juvenile fish (Felip et al., 2008), as shown in this study. In yellowtail (*Seriola quinqueradiata*), 11-KT plays an important physiological role in gonadal development and stimulates early mitotic divisions of spermatogonia toward meiosis (Higuchi et al., 2017). In addition, our results also revealed that LL evoked changes on the plasmatic levels of sex steroids as previously observed in this species (Begtashi et al., 2004; Rodríguez et al., 2005; Felip et al., 2008) and others (Ammar et al., 2015). Studies on fish report that estrogens evoke germ cell proliferation (Amer et al., 2001; Song and Gutzeit, 2003; Kobayashi et al., 2011) and even inhibit spermatogonia proliferation and induce the post-spawning process (Chaves-Pozo et al., 2007). In sea bass under LLa/s and LL, the low levels of E₂ in early September were concomitant with a reduced number of spermatogonial mitoses as compared to the NP group,

suggesting that E_2 might be related to spermatogonial proliferation during early gonadal development in this species. In addition, while testicular *erβ1* and *erβ2* expression was similar among groups during early gametogenesis, a significant decrease in *amh* expression was observed with the concomitant decrease of circulating levels of 11-KT and Fsh under LL regimes. This may suggest a possible mechanism of endocrine control over early events of gametogenesis in male sea bass, in which the lack of increasing 11-KT levels presumably induced by Fsh are unable to block *amh* expression. Consequently, Amh may act as a meiosis inhibiting factor and prevent spermatogenesis progression, as previously demonstrated in male sea bass (Mazón et al., 2014; Rocha et al., 2016; Blázquez et al., 2017). In this respect, several studies have shown that *amh* expression in the testes is downregulated by 11-KT in eel (Miura et al., 2002) and also in zebrafish (Skaar et al., 2011) and Atlantic salmon (Melo et al., 2015), although its biological function needs to be further investigated in fish. Interestingly, a positive regulation of Fsh on *star* expression has been described in mammals (Balasubramanian et al., 1997; Sekar et al., 2000). In adult male sea bass, *star* expression increases as spermatogenesis proceeds, reaching a peak at advanced gonadal stages during the first sexual maturation, supporting the involvement of the coded protein in the synthesis of sea bass progestins (Rocha et al., 2009). In this regard, the relationship among these profiles in juvenile males needs to be further investigated in order to gather a better understanding of the rapid delivery of cholesterol substrate, which requires the Star protein, during early gametogenesis. In conclusion, this study demonstrates that, over the course of the photosensitive period, the LL regime modulates the rhythm and/or amplitude of some important reproductive factors (**Fig. 5.7**) during early gametogenesis in male sea bass, which results in disturbances that drastically affect gonadal maturation and reduce precocity in a marine teleost fish.

Parameters	Photoperiod regimes			Histological, biochemical and gene expression changes	
	NP	LLa/s	LLy		
GnRH1	Black	White	White	Protein content	Brain
GnRH2	Black	White	White	Protein content	
GnRH3	Grey	Grey	Grey	Protein content	
<i>fshβ</i>	Black	White	White	mRNA transcripts	Pituitar
T	Black	White	White	Hormonal levels	
11-KT	Black	White	White	Hormonal levels	Blood
E2	Black	White	White	Hormonal levels	
Fsh	Black	White	White	Hormonal levels	
<i>erβ1</i>	Grey	Grey	Grey	mRNA transcripts	Gonad
<i>erβ2</i>	Grey	Grey	Grey	mRNA transcripts	
<i>amh</i>	White	Black	Black	mRNA transcripts	
<i>star</i>	White	Grey	Black	mRNA transcripts	
SPGA mitosis	Black	White	White	Mitosis/mm ²	
Stg I	Grey	Black	Black	Gonadal development	
Stg IV	Black	Grey	Grey	Gonadal development	
Spermiation	Black	Grey	Grey	Sperm release	
GSI	Black	Grey	Grey	Gonadosomatic index	

Figura 5.7. Summary of the effects of continuous light during the photolabile period at early gametogenesis on histological, biochemical and gene expression changes of some relevant parameters related to the maturation process in juvenile male sea bass kept under natural photoperiod (NP), continuous light (LL) from 15 aug to 15 sep in otherwise NP (LLa/s) and LL all year around (LLy). The shading in each box represents the levels of the variable being considered: white, significantly low levels; grey, low-intermediate levels without significant differences and black, significantly high levels.

Acknowledgements

We would like to thank C. Marín and X. Simó for their technical assistance rearing and sampling the fish, J. Monfort and L. Rodríguez for their help with histological procedures and S. Ibañez for her assistance with sampling analysis. This research was supported by grants Q5RS-2002-01801 (PUBERTIMING) from UE, Generalitat Valenciana Grupos 04/80 and PROMETEO 2010/003-2014/051, Ministerio de Ciencia y Tecnología, with special action No. AGL2002-12470-E,

AGL2009-11086 and AGL2016-75400-R from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) of Spain. R.R. was supported by an FPI fellowship from MICINN.

References

- Alvarado, M.V., Carrillo, M., Felip, A., 2015. Melatonin-induced changes in kiss/gnrh gene expression patterns in the brain of male sea bass during spermatogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Mol. Integ. Physiol.* 185, 69-79.
- Amer, M.A., Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K., 2001. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biol. Rep.* 65(4), 1057-1066.
- Ammar, I. B., Teletchea, F., Milla, S., Ndiaye, W. N., Ledoré, Y., Missaoui, H., Fontaine, P., 2015. Continuous lighting inhibits the onset of reproductive cycle in pikeperch males and females. *Fish Physiol. Biochem.* 41(2), 345-356.
- Balasubramanian, K., LaVoie, H. A., Garmey, J. C., Stocco, D. M., Veldhuis, J. D., 1997. Regulation of porcine granulosa cell steroidogenic acute regulatory protein (StAR) by insulin-like growth factor I: synergism with follicle-stimulating hormone or protein kinase A agonist. *Endocrinology* 138(1), 433-439.
- Barnabé, G., 1995. The sea bass. In C.E. Nash, A.J. Novotny (eds.), *Production of aquatic animals*. Elsevier, Oxford, pp. 269-287.
- Begtashi, I., Rodríguez, L., Molés, G., Zanuy, S., Carrillo, M., 2004. Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). I. Morphological aspects. *Aquaculture* 241, 539-559.

- Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W., McNeil, J.H., 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives, and simple stains. *Stain Technology* 51, 71-94.
- Biswas, A., Takaoka, O., Kumai, H., Takii, K., 2016. Combined effect of photoperiod and self-feeder on the growth performance of striped knifejaw, *Oplegnathus fasciatus*. *Aquaculture* 452, 183-187.
- Blázquez, M., González, A., Papadaki, M., Mylonas, C., Piferrer, F., 2008. Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 158, 95-101.
- Blázquez, M., Medina, P., Crespo, B., Gómez, A., Zanuy, S., 2017. Identification of conserved genes triggering puberty in European sea bass males (*Dicentrarchus labrax*) by microarray expression profiling. *BMC Genomics* 18(1), 441.
- Boeuf, G., Le Bail, P. Y., 1999. Does light have an influence on fish growth?. *Aquaculture* 177(1-4), 129-152.
- Bromage, N, Porter, M., Randall, C., 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197, 63-98.
- Brown, C., Miltiadou, D., Anastasiades, G., 2014. Precocious female maturation in seacage populations of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) in Cyprus. Poster, *Aquaculture Europe 2014*, San Sebastián, Spain.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Serrano, R., Bromage, N., 1993. Environmental and hormonal control of reproduction in sea bass. In: *Recent Advances in Aquaculture IV*. (N.Bromage, E.M. Donaldson, M. Carrillo, S. Zanuy and J. Planas Eds.), pp: 43-54. Blakwell Scientific Publications, Oxford, Great Britain.

- Carrillo, M., Zanuy, S., Felip, A., Bayarri, M. J., Molés, G., Gómez, A., 2009. Hormonal and environmental control of puberty in perciform fish. *Annals of the New York Acad. Sci.* 1163(1), 49-59.
- Carrillo, M., Begtashi, I., Rodríguez, L., Marin, M. C., Zanuy, S., 2010. Long photoperiod on sea cages delays timing of first spermiation and enhances growth in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 299(1-4), 157-164.
- Carrillo, M., Espigares, F., Felip, A., Escobar, S., Molés, G., Rodríguez, R., Alvarado, M.V., Gómez, A. y Zanuy, S., 2015. Updating control of puberty in male European sea bass: a holistic approach. *Gen. Comp. Endocrinol.* 221, 42-53.
- Chaves-Pozo, E., Liarte, S., Vargas-Chacoff, L., García-López, A., Mulero, V., Meseguer, J., Mancera, J.M., García-Ayala, A., 2007. 17Beta-estradiol triggers postspawning in spermatogenically active gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) males. *Biol. Rep.* 76(1), 142-148.
- Crespo, B., Gómez, A., Mazón, M. J., Carrillo, M., Zanuy, S., 2013. Isolation and characterization of Ff1 and Gsdf family genes in European sea bass and identification of early gonadal markers of precocious puberty in males. *Gen. Comp. Endocrinol.* 191, 155-167.
- Døskeland, I., Imsland, A. K. D., Fjellidal, P. G., Stefansson, S. O., Roth, B., Eriksen, K. E., Mikalsen, B., Handeland, S., 2016. The effect of low temperatures and photoperiods on growth and vertebra morphometry in Atlantic salmon. *Aquacult. Internat.* 24(5), 1421-1434.
- Escobar, S., Felip, A., Salah, M., Zanuy, S., Carrillo, M., 2014. Long-term feed restriction in prepubertad male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) increases the number of apoptotic cells in the testis and affects the onset of puberty and some sperm quality parameters. *Aquaculture* 433, 504-512.

- Espigares, F., Rocha, A., Molés, G., Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S. 2015a. New insights into the factors mediating the onset of puberty in sea bass. *Gen. Comp. Endocrinol.* 224, 176-185.
- Espigares, F., Zanuy, S., Gómez, A., 2015b. Kiss2 as a regulator of Lh and Fsh secretion via paracrine/autocrine signaling in the teleost fish European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol. Rep.* 93(5) 114, 1-12.
- Espigares, F., Rocha, A., Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S., 2017. Photoperiod modulates the reproductive axis of European sea bass through regulation of *kiss1* and *gnrh2* neuronal expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 240, 35-45.
- Falcón, J., Migaud, H., Muñoz-Cueto, J.A., Carrillo, M., 2010. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 469-482.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., 2006. Comparative analysis of growth performance and sperm motility between precocious and non-precocious males in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 256(1-4), 570-578.
- Felip, A., Zanuy, S., Muriach, B., Cerdá-Reverter, J.M., Carrillo, M., 2008. Reduction of sexual maturation in male *Dicentrarchus labrax* by continuous light both before and during gametogenesis. *Aquaculture* 275, 347–355.
- Felip, A., Rodríguez, R., Zanuy, S., Carrillo, M., 2017. Effect of combining different photoperiod regimes on the sexual maturation of male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during the first two years of life. *J. Aquacult. Mar. Biol.* 5(4), 1-9.
- Halm, S., Rocha, A., Miura, T., Prat, F., Zanuy, S., 2007. Anti-Müllerian hormone (AMH/AMH) in the European sea bass: its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms. *Gene* 388(1), 148-158.

- Higuchi, K., Gen, K., Izumida, D., Kazeto, Y., Hotta, T., Takashi, T., Aono, H., Soyano, K., 2017. Changes in plasma steroid levels and gene expression of pituitary gonadotropins, testicular steroidogenesis-related proteins and insulin-like growth factors during spermatogenesis of the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fish. Sci.* 83(1), 35-46.
- Holland, M. C. H., Gothilf, Y., Meiri, I., King, J. A., Okuzawa, K., Elizur, A. Zohar, Y., 1998. Levels of the native forms of GnRH in the pituitary of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, at several stages of the gonadal cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112, 394–405.
- Hoskins, L.J., Xu, M., Volkoff, H., 2008. Interactions between gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and orexin in the regulation of feeding and reproduction in goldfish (*Carassius auratus*). *Horm. Behav.* 54(3), 379-385.
- Imsland, A. K., Folkvord, A., Stefansson, S.O., 1995. Growth, oxygen consumption and activity of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) reared under different temperatures and photoperiods. *Netherlands J. Sea Res.* 34(1-3), 149-159.
- Imsland, A.K., Jonassen, T.M., Hangstad, T.A., Stefansson, S.O., Elvegård, T.A., Lemmens, S.C., Urskog, T.C., Nytrøc, A.V., Reynholds, P., 2018. The effect of continuous light and compressed photoperiods on growth and maturation in lumpfish *Cyclopterus lumpus*. *Aquaculture* 485, 166-172.
- Jonassen, T.M., Imsland, A.K., Kadowaki, S., Stefansson, S.O., 2000. Interaction of temperature and photoperiod on growth of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. *Aquacult. Res.* 31(2), 219-227.
- Kah, O., Zanuy, S., Pradelles, P., Cerdá, J. L., Carrillo, M., 1994. An enzyme immunoassay for salmon gonadotropin-releasing hormone and its application to the study of the effect of diet on brain and pituitary GnRH in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 464–474.

- Kashyap, A., Chandra Pathak, B., Awasthi, M., Serajuddin, M., 2015. Effect of different photoperiods on the growth and survival of juvenile of Indian major carp, *Catla catla*. Iranian J. Fish. Sci. 14(4), 946-955.
- Kobayashi, Y., Nozu, R., Nakamura, M., 2011. Role of estrogen in spermatogenesis in initial phase males of the three-spot wrasse (*Halichoeres trimaculatus*): Effect of aromatase inhibitor on the testis. Develop. Dynamics 240(1), 116-121.
- Kortner, T.M., Rocha, E., Silva, P., Castro, L.F.C., Arukwe, A., 2008. Genomic approach in evaluating the role of androgens on the growth of Atlantic cod (*Gadus morhua*) previtellogenic oocytes. Comp. Bioch. Physiol. Part D 3, 205-218.
- Martins, R.S., Gomez, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Canário, A.V., 2015. Photoperiodic modulation of circadian clock and reproductive axis gene expression in the pre-pubertal European sea bass brain. PloS one 10(12), e0144158.
- Mateos, J., Mañanós, E., Martínez-Rodríguez, G., Carrillo, M., Querat, B., Zanuy, S., 2003. Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (α , FSH β , and LH β) and their expression during the reproductive cycle. Gen. Comp. Endocrinol. 133(2), 216-232.
- Matsuda, K., Nakamura, K., Shimakura, S. I., Miura, T., Kageyama, H., Uchiyama, M., Shioda, S., Ando, H., 2008. Inhibitory effect of chicken gonadotropin-releasing hormone II on food intake in the goldfish, *Carassius auratus*. Horm. Behav. 54(1), 83-89.
- Maugars, G., Schmitz, M., 2008. Gene expression profiling during spermatogenesis in early maturing male Atlantic salmon parr testes. Gen. Comp. Endocrinol. 159(2-3), 178-187.
- Mazón, M. J., Gómez, A., Yilmaz, O., Carrillo, M., Zanuy, S., 2014. Administration of follicle-stimulating hormone in vivo triggers testicular recrudescence of

- juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Biol. Rep. 90(1) 6, 1-10.
- McDowell, E.M., Trump, B.F., 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. Archives of Pathol. Lab. Medicine 100, 405-414.
- Melo, M. C., van Dijk, P., Andersson, E., Nilsen, T. O., Fjellidal, P. G., Male, R., Nijenhuis, W., Bogerd, J., de França, L. R., Taranger, G. L., Schulz, R. W., 2015. Androgens directly stimulate spermatogonial differentiation in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). Gen. Comp. Endocrinol. 211, 52-61.
- Migaud, H., Davie, A., Taylor, J.F., 2010. Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. J. Fish Biol. 76(1), 27-68.
- Miura, T., Miura, C., Konda, Y., Yamauchi, K., 2002. Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. Development 129(11), 2689-2697.
- Molés, G., Carrillo, M., Mañanós, E., Mylonas, C. C., Zanuy, S., 2007. Temporal profile of brain and pituitary GnRHs, GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Gen. Comp. Endocrinol. 150(1), 75-86.
- Molés, G., Gómez, A., Rocha, A., Carrillo, M., Zanuy, S., 2008. Purification and characterization of follicle-stimulating hormone from pituitary glands of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Gen. Comp. Endocrinol. 158, 68-76.
- Molés, G., Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S., 2012. Development of a homologous enzyme-linked immunosorbent assay for European sea bass FSH. Reproductive cycle plasma levels in both sexes and in yearling precocious and non-precocious males. Gen. Comp. Endocrinol. 176, 70-78.
- Morinaga, C., Saito, D., Nakamura, S., Sasaki, T., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Tanaka, M., Kondoh, H., 2007. The hoteli mutation of medaka in the anti-Müllerian hormone receptor causes the

dysregulation of germ cell and sexual development. *Proceed. Nat. Acad. Sci.* 104(23), 9691-9696.

Navarro, R.D., Souza, S.C., Bizarro, Y.W.S., Silva, R.F., Navarro, F.K.S.P., 2015. Effects of photoperiod on somatic growth and gonadal development in male Nile tilapia. *Acta Scientiarum Tech.* 37(4), 381-385.

Nóbrega, R.H., Morais, R.D.V. de S., Crespo, D., de Waal, P.P., de França, L.R., Schulz, R.W., Bogerd, J., 2015. Fsh stimulates spermatogonial proliferation and differentiation in zebrafish via Igf3. *Endocrinology* 156 (10), 3804-3817.

Planas, J.V., Swanson, P., 2008. Physiological function of gonadotropins in fish. In: *Fish Reproduction*. Rocha, M.; Arukwe, A.; Kapoor, B.G., eds. Science Publishers, Inc. Enfield, New Hampshire. ISBN: 978-1-57808-331-2, pp. 37-68.

Rocha, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Gómez, A, 2009. Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass. *Gen. Comp. Endocrinol.* 162(3), 265-275.

Rocha, A., Zanuy, S., Gómez, A., 2016. Conserved anti-Müllerian hormone: anti-Müllerian hormone type-2 receptor specific interaction and intracellular signaling in teleosts. *Biol. Rep.* 94(6) 141, 1-13.

Rodríguez, L., Begtashi, I, Zanuy, S., Carrillo, M., 2000a. Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: Effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) at puberty. *Fish Physiol. Biochem.* 23, 141-150.

Rodríguez, L., Carrillo, M., Sorbera, L.A., Soubrier, M.A., Mañanós, E., Holland, M.C.H., Zohar, Y., Zanuy, S., 2000b. Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) during sex differentiation and first spawning season. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120, 67-74.

- Rodríguez, L., Begtashi, I., Zanuy, S., Saw, M., Carrillo, M., 2001a. Changes in levels of reproductive hormones during first maturation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under artificial day light. *Aquaculture* 202, 235-248.
- Rodríguez, L., Zanuy, S., Carrillo, M., 2001b. Influence of day length on the age at first maturity and somatic growth in male sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. *Aquaculture* 196, 159-175.
- Rodríguez, L., Begtashi, I., Zanuy, S., Carrillo, M., 2005. Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). II. Hormonal aspects. *Gen. Comp. Endocrinol.* 140, 116–125.
- Rodríguez, R., Felip, A., Cerqueira, V., Hala, E., Zanuy, S., Carrillo, M., 2012. Identification of a photolabile period for reducing sexual maturation in juvenile male sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by means of a continuous light regime. *Aquacult. Internat.* 20, 1071-1083.
- Rubio, V.C., Sanchez-Vazquez, F.J., Madrid, J.A., 2004. Oral administration of melatonin reduces food intake and modifies macronutrient selection in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Pineal Res.* 37(1), 42-47.
- Schulz, R. W., De França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165(3), 390-411.
- Sekar, N., Garmey, J. C., Veldhuis, J. D., 2000. Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells: joint amplification of pivotal sterol-regulatory genes encoding the low-density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (stAR) protein and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) enzyme. *Mol. Cel. Endocrinol.* 159(1-2), 25-35.

- Servili, A., Lethimonier, C., Lareyre, J. J., López-Olmeda, J. F., Sánchez-Vázquez, F. J., Kah, O., Muñoz-Cueto, J. A., 2010. 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* 151(5), 2265-2275.
- Shin, H. S., Song, J. A., Choi, J. Y., Kim, N. N., Choi, Y. J., Sung, S. N., Park, M. S., Min, B. H., Choi, C. Y., 2014. Effects of various photoperiods on kisspeptin and reproductive hormones in the goldfish, *Carassius auratus*. *Anim. Cells Syst.* 18(2), 109-118.
- Shiraishi, E., Yoshinaga, N., Miura, T., Yokoi, H., Wakamatsu, Y., Abe, S. I., Kitano, T., 2007. Mullerian inhibiting substance is required for germ cell proliferation during early gonadal differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology* 149(4), 1813-1819.
- Skaar, K. S., Nobrega, R. H., Magaraki, A., Olsen, L. C., Schulz, R. W., Male, R., 2011. Proteolytically activated, recombinant anti-Müllerian hormone inhibits androgen secretion, proliferation, and differentiation of spermatogonia in adult zebrafish testis organ cultures. *Endocrinology* 152(9), 3527-3540.
- Sokal R. R., Rohlf F. J., 1981. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research* (2nd edn). W.H. Freeman, NY, 859 pp.
- Song, M., Gutzeit, H. O., 2003. Effect of 17- α -ethynylestradiol on germ cell proliferation in organ and primary culture of medaka (*Oryzias latipes*) testis. *Develop. Growth Differentiation* 45(4), 327-337.
- Stefánsson, M.Ö, FitzGerald, R. D., Cross, T.F., 2002. Growth, feed utilization and growth heterogeneity in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* (Rafinesque) under different photoperiod regimes. *Aquacult. Res.* 33(3), 177-187.
- Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien F-A., Dufour, S., Karlsen, O., Norberg, B., Andersson, E., Hansen,

T., 2010. Control of puberty in farmed fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165(3), 483-515.

Veras, G.C., Brabo, M.F., Dias, J.A., Abe, H.A., Nunes, Z.M.P., Murgas, L.D.S., 2016. The effect of photoperiod and feeding frequency on larval of the Amazonian ornamental fish *Pyrrhulina brevis* (Steindachner, 1876). *Aquac. Res.* 47 (3), 797-803.

Volkoff, H., Hoskins, L.J., Tuziak, S.M., 2010. Influence of intrinsic signals and environmental cues on the endocrine control of feeding in fish: potential application in aquaculture. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167(3), 352-359.

Wu, G.C., Chiu, P.C., Lyu, Y.S., Chang, C.F., 2010. The expression of *amh* and *amhr2* is associated with the development of gonadal tissue and sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Biol. Rep.* 83(3), 443-453.

CAPÍTULO 6
ARTÍCULO 3

Effect of Combining Different Photoperiod Regimes on the Sexual Maturation of Male Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) During the First Two Years of Life

Publicado en Journal of Aquaculture and Marine Biology 2017, 5(4): 00129

Alicia Felip¹ Rafael Rodríguez¹ Silvia Zanuy¹ and Manuel Carrillo¹

¹Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal, 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, Spain.

Introduction

Control over reproduction is one of the major challenges in the fish farming of commercial aquaculture species, as it is crucial for improving fishery production. Numerous studies have provided relevant information related to genetic, hormonal and environmental approaches for controlling sexual maturation in farmed finfish [1-3]. In particular, environmental tools based on manipulating the photoperiod have been investigated, demonstrating their potential application in aquaculture [1, 4, 5, 6]. However, since differences between indoor and outdoor conditions can exist, their utility on a commercial scale needs to be examined [7, 8]. A large number of environmental factors are known to potentially control reproduction in most temperate fish, including sea bass. In this regard, while temperature can affect reproductive development, photoperiod is thought to be the main environmental cue for many seasonal breeders [1, 4]. In fact, it is well documented that photoperiod plays an important role in the control of gonadal maturation in farmed fish species such as salmonids, gadoids, breams, bass and flatfish [5, 4, 6]. The European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) is a highly-prized marine teleost fish that in Mediterranean areas reaches puberty at 2 years of age in males, and at around 3-4 years in females under natural conditions [7, 9]. However, under intensive culture conditions, a non-negligible number of under yearling males (i.e., 20-30% of the population) exhibit precocious maturation, which negatively affects their farming and commercialization [5, 9]. Although data are still limited, precocity

also seems to affect farmed females (S. Zanuy and M. Carrillo, personal communication). This is an especially critical situation, since farmed sea bass often show skewed sex ratios, with 70% (or more) of males exhibiting 20-40% lower body weight at harvest [5, 9, 10]. Although precocious males are larger in size and have higher gonadosomatic index (GSI) values during their first year of life, they show a reduced body size with respect to their counterparts over their second year of life [11, 12]. The effect of photoperiod on sexual maturation, somatic growth and hormonal aspects has been studied in this species for more than three decades now [7, 11, 13-21]. Recently, the analysis of the effect of discrete windows of continuous light (LL, 24 h light/day) on sexual maturation has shown that LL regimes reduce precocious gonadal maturation in juvenile male sea bass during their first year of life [5,11, 19, 20, 21]. Interestingly, it has been confirmed that including the month of September in the LL this time interval is crucial for reducing precocious gametogenesis in male sea bass, as this is considered to be the most sensitive photolabile period in this species [21]. Furthermore, it is known that administration of a constant long photoperiod (LP) (15L:9D; light: darkness) delays the onset of puberty in sea bass [9, 15, 17, 18]. Consequently, the combination of different photoperiods might be a useful environmental strategy to control gonadal development in fish. This is supported by previous studies on male sea bass examining the influence of day length on a number of physiological variables during the first two [7] or three [17] years of life. One aim of this study was to explore the effect of LL both at year one (already well documented) and at year two, the time at which the onset of male puberty generally takes place under natural conditions. The effect of LL at this time is completely unknown, although it is a very important aspect to be considered for the environmental control of reproduction and for assessing the likely existence of an endogenous reproductive component. The second aim was to monitor gonadal growth during the first two annual cycles of life in male groups kept under different combinations of photoperiod regimes to determine their capacity to reduce the rates of precocity at year one exposure to LL [11, 20, 21] and delay the onset of puberty at year two exposure to LP [14, 15, 17, 18]. To that end, three independent trials were set up to explore, under laboratory conditions, the effect of day length and natural conditions of temperature on growth performance, gonadal size and the rates of running males up to the age at which fish reach a commercial size (450-500 g) and are harvested. In Trial 1 (T1), underyearling male sea bass were exposed to NP (control) or LL for 24 consecutive months to study the inhibitory effect of continuous light on gonadal

development during the first and second annual cycle. Trial 2 (T2) used the same experimental design as Trial 1, except that continuous light was replaced by two shorter exposures to LL (4 months (year one) and 2.5 months (year two) in duration) within the sensitive photolabile period in the summer-early autumn [21], and the results were then compared to those of T1. This is of particular interest in commercial operations, because if reduced lighting were able to impair sexual maturation, it would help minimize the stress on animals and would reduce farming costs by providing for optimal yields in fish farms. Finally, in Trial 3 (T3), fish were exposed to either NP or LL conditions for 12 consecutive months during the first annual cycle (i.e., year one). Subgroups of these groups were then exposed to either NP or LP during year two, in order to evaluate the effect of the photoperiod regimes applied on delaying the onset of puberty and enhancing growth at the age of commercialization.

Materials and methods

Fish and experimental conditions

All juvenile male sea bass (2-4 g) were purchased from Aquanord (Gravelines, France) and distributed into separate identical 2000 L light-proof circular fiberglass tanks provided with well-aerated running sea water (salinity=37-38%) at the Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (Castellón, Spain, 40°N; 0°E) facilities. Temperature naturally ranged between 12-25 ± 1°C. The feeding regime was adjusted according to temperature and fish size, based on standard procedures [22]. Different photoperiod regimes were combined and implemented in three independent trials, in order to study the effect of photoperiod on gonadal growth during two consecutive annual cycles: the incipient reproductive period (first annual cycle; year one) and the puberty period (second annual cycle; year two) [7]. Somatic growth was evaluated during the second annual cycle, coinciding with the full reproductive season of male fish (Figure 6.1) [7].

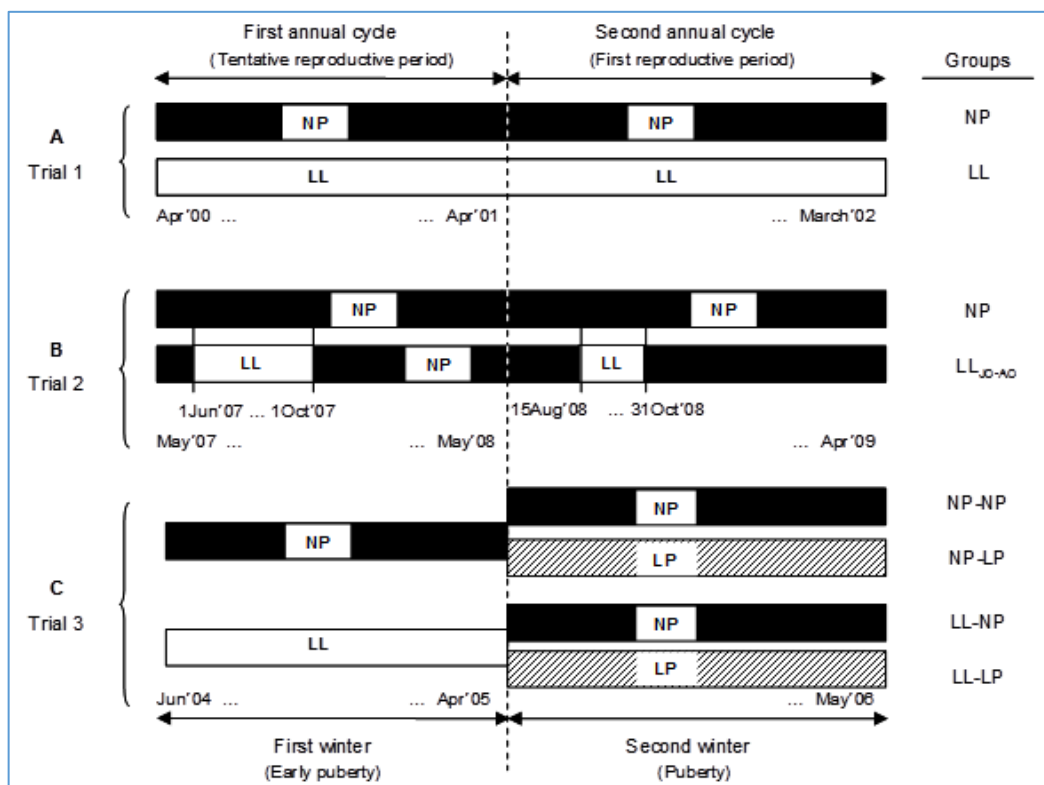


Figura 6.1. Schematic representation of the experimental designs and photoperiod regimes for the three independent trials conducted in this study. Trial 1 (A) compared exposure to a constant simulated natural photoperiod (NP) versus constant continuous light (LL) during two consecutive annual cycles. Trial 2 (B) compared exposure to NP during two consecutive annual cycles with exposure to continuous light from June 1 to October 1 (first annual cycle) and from August 15 to October 31 (second annual cycle) under otherwise NP conditions (LL_{JO-AO}). Trial 3 (C) compared four groups exposed to either NP or LL during the first annual cycle, followed by exposure to either NP or a constant long photoperiod of 15L:9D (LP) during the second annual cycle.

The first trial (T1) compared two experimental groups (n = 810 fish; 405 fish/tank): one group exposed to a constant simulated natural photoperiod (NP) and the other maintained under constant continuous light (LL) throughout the first and second annual cycles (Figure 6.1A). The second trial (T2) also included two groups (n= 180 fish; 90 fish/tank). The first group, which acted as a control, was exposed to NP during the entire first and second annual cycles. The second group, on the other hand, was maintained under LL within two different time windows: from June 1 to October 1 (LL_{JO} for 4 months) during the first year and from August 15 to October 31 (LL_{AO} for 2.5 months) during the second year, and otherwise NP during the remaining periods (Figure 6.1B). This latter group is referred to as LL_{JO-AO} throughout this study. Of note, both LL treatments applied in this trial included the month of September, as this time interval was identified as the most sensitive

photolabile period in this species [21]. In the third trial (T3, n= 348 fish; 174 fish/tank), one group was maintained under NP and a second group under LL conditions during the first year. Coinciding with the resting period (April) of the first annual reproductive cycle of animals, each fish group was equally distributed into two subgroups, which were subsequently exposed to either a natural light cycle (NP) or a constant long photoperiod (LP) with a natural day length of 15L:9D until the end of the experiment, which coincided with the end of the second annual reproductive cycle (Figure 6.1C). Thus, there were a total of four groups (n =330 fish; 80-82 fish/tank): NP-NP, NP-LP, LL-NP and LL-LP, according to the photoperiod regime they were exposed to during the first and second experimental phases. Artificial light regimes were regulated by means of electronic timers that controlled tungsten bulbs (650-700 lux; Philips, PAR38Pro) located at the water's surface. Fish were fed to apparent satiety by automatic feeders that administered pellets from Proaqua Nutrición S.A. (Palencia, Spain) (protein 54-45%, lipids 20-12%, carbohydrates 9-25%, ash 11%, moisture 1-3%, DE 22.4-19.7 MJ kg⁻¹).

Sampling protocol

To evaluate growth performance during the second annual cycle of life (i.e., year two), fish were anesthetized with 2-phenoxyethanol (0.5 mL L⁻¹ of seawater) before sampling. Each month, the animals from each tank were weighed (W) and measured (L; fork length), and a condition factor was calculated as $100 \times W/L^3$. Specific growth rates for weight (GW) and length (GL) were calculated in each sampling as $100 (\ln W_f - \ln W_i) / t - 1$ and $100 (\ln L_f - \ln L_i) / t - 1$, respectively, where W_f and L_f are the final weight (g) and length (cm), W_i and L_i the initial weight and length, and t is the number of days between samplings. Gonad weight was measured in sampled fish from T1 and T3, and the gonadosomatic index (GSI) was calculated according to the formula: gonad weight/body weight x 100. Animals were sacrificed in accordance with the guidelines for animal experiments established by European legislation (ETS No. 123, 01/01/91). Males were periodically stripped in a gentle manner to evaluate spermiation in each trial and calculate the percentage of spermiating males during the first two years of life. Moreover, fish in T2 were gently massaged approximately every fifteen days to record the first spermiation time of individual animals and the cumulative percentage of spermiating fish from the beginning of the experiments on, as well as the duration of spermiation (in days) during the second annual cycle.

Statistical analysis

A one-way ANOVA test was used to compare the effects of the different photoperiod regimes on growth performance and GSI. When necessary, normality was determined by means of a Kolmogorov-Smirnoff test after the logarithmic transformation of data. Barlett's test was used to establish homogeneity of variances. Tukey's HSD multiple range test was used to examine significant differences between means. Nominal data on the percentage of spermiating fish versus non-spermiating fish under the different photoperiod regimes were compared using the Chi-Square statistic and applying the Yates correction, when $v = 1$, or a Bonferroni inequality for P values when applying the multiple range test. A linear regression analysis was conducted to determine the relationships between the condition factor and GW, and between the percentage of spermiating males and GL, taking into account the results of all three trials in the present study. All data were expressed as mean \pm SEM. Differences were accepted as significant when $P < 0.05$ [23].

Results

Growth

In order to evaluate the influence of combining different photoperiod regimes on the somatic growth of 2-year-old males over a two-year period, values for weight, length and condition factor were recorded in all three trials (Figure 6.2). Specific increases in weight and length are shown in Figure 6.3. Two different periods could be distinguished in the second annual cycle of life: a period of active somatic growth (May-June to November) and a period of reduced growth (November to April-May), when male sea bass are known to reach puberty (i.e., full gonadal development). The results show that the curve of weight and size increase in LL fish (i.e., LL group in T1 and LLJO-AO group in T2) throughout this time interval had a similar shape to that of their respective NP control groups. However, it is interesting to note that LL groups exhibited significantly lower size values ($P < 0.05$) than the corresponding NP groups throughout the entire experiment, and as a result the size of the control groups (NP) at 17-18 months of age was significantly larger than that of the LL and LLJO-AO groups (Figure 6.2A-B & Figure 6.2D-E). Differences were particularly marked during the period of active somatic growth in both T1 and T2. After 25-26 months of rearing, the mean

values for weight and length of the NP group in T1 were 451.78 ± 12.46 g and 31.71 ± 0.27 cm, as compared to 414.81 ± 8.68 g and 30.79 ± 0.21 cm in the LL group (T1) (Figure 6.2A-B). In T2, the mean values for the NP group were 483.99 ± 19.71 g and 31.32 ± 0.36 cm versus 434.39 ± 10.62 g and 30.44 ± 0.27 cm for the LLJO-AO group (Figure 6.2D-E). Overall, this represented an 8-10% and a 3% decrease in weight and length, respectively, in the LL groups with respect to the control groups. At the end of this period (approximately 27-28 months of age), significant weight differences were observed between the NP and LL groups, with the LL group exhibiting higher values than the NP group in T1 (Figure 6.2A), but lower ones in T2 (Figure 6.2D). During the second half of the full gonadal development period, no significant differences were observed in length between groups for either T1 or T2 (Figure 6.2B-E). In T3, the differences among groups were particularly noticeable at the end of the full gonadal development period (31 months of age). The mean weight and length values at this time point were 624.24 ± 15.03 g and 35.63 ± 0.25 cm for the NP-NP group (control), 668.39 ± 27.67 g and 36.19 ± 0.44 cm for the NP-LP group, 562.98 ± 19.14 g and 34.59 ± 0.33 cm for the LL-NP group, and 576.63 ± 19.12 g and 34.69 ± 0.32 cm for the LL-LP group (Figure 6.2G-H). This represented a weight and length increase of 2.4-7% and 0.3-1.5%, respectively, for those groups exposed to LP regimes, as compared to those exposed to NP during the second annual cycle. It is important to note that the potential stressful impact of exposing the fish to LL throughout the first year might influence their growth during the second year, thus masking the stimulatory effect of LP on growth during that period. Interestingly, the NP-LP group, which was not exposed to LL at anytime during the study, showed enhanced growth during the second year, which is when the animals were exposed to LP (Figure 6.2G-H) arrows. In order to assess more precisely the effects of photoperiod on sea bass growth, we analyzed the specific growth rate, which refers to the growth of a given group of fish over a fixed time interval. Overall, our results showed a strong increase in the specific growth rates of weight and length in all three trials between June-July and November, as compared to the values observed during the full gonadal development period. In each trial, the experimental group and the control group kept under simulated natural light (NP) showed a similar pattern of specific growth rate, although the maximum values achieved by both groups differed between trials. In this sense, the highest GW (around 1.2%) of all trials in the second active growth period was seen in T2 during the July-August time interval for both the NP and LLJO-AO groups (Figure 6.3C). GW peaked (0.71-

0.81%) in June-July for all T3 groups (Figure 6.3E), and also for both NP and LL groups in T1 (Figure 6.3A), albeit with lower values (0.4%). Accordingly, differences in the maximum GW averages in this study were as follows: T2>T3>T1. On the other hand, the maximum specific growth rate for length was achieved during the September-October time interval in the case of T1 (GL > 0.80% for NP and LL groups) (Figure 6.3B). The average value of GL in T2 was > 0.30% in August-September for both the NP and LLJO-AO groups (Figure 6.3D), while all groups in T3 showed values of around 0.23-0.28% GL in July-August (Figure 6.3F). Accordingly, maximum GL averages were recorded in T1, while those of T2 and T3 were similar to one another. In contrast to the period of active somatic growth, the full gonadal development period was characterized by a reduction in the specific growth rate of weight and length in all groups of every trial (Figure 6.3). Specific growth rate was higher in LL versus NP groups at some sampling points during the full gonadal development period, while high specific growth rates were recorded in LP groups after 29-31 months of rearing (March-May), which evidenced the growth enhancing effect of LP on sea bass (Figure 6.3E-F). The pattern of variation for the condition factor in all three trials is depicted in Fig. 6.2. It can be seen that trials which displayed high condition factor values also had elevated GW values. Consequently, the fish in T2, which had greater GW values than those in T3 and T1, also reached the highest condition factor values (Figure 6.2F) during the second annual cycle. Overall, the variations in maximum average condition factor values in all three trials were in line with those previously observed for GW (T2>T3>T1). CF values for the control groups in all three trials (NP in T1 and T2, and NP-NP in T3) were plotted as a function of GW and a regression line was fit to the data points to estimate the increase in CF according to changes in GW. The values of the determination coefficients ($R^2=0.933$ and $R^2=0.985$) evidenced a strong association between both variables (Figure 6.4A).

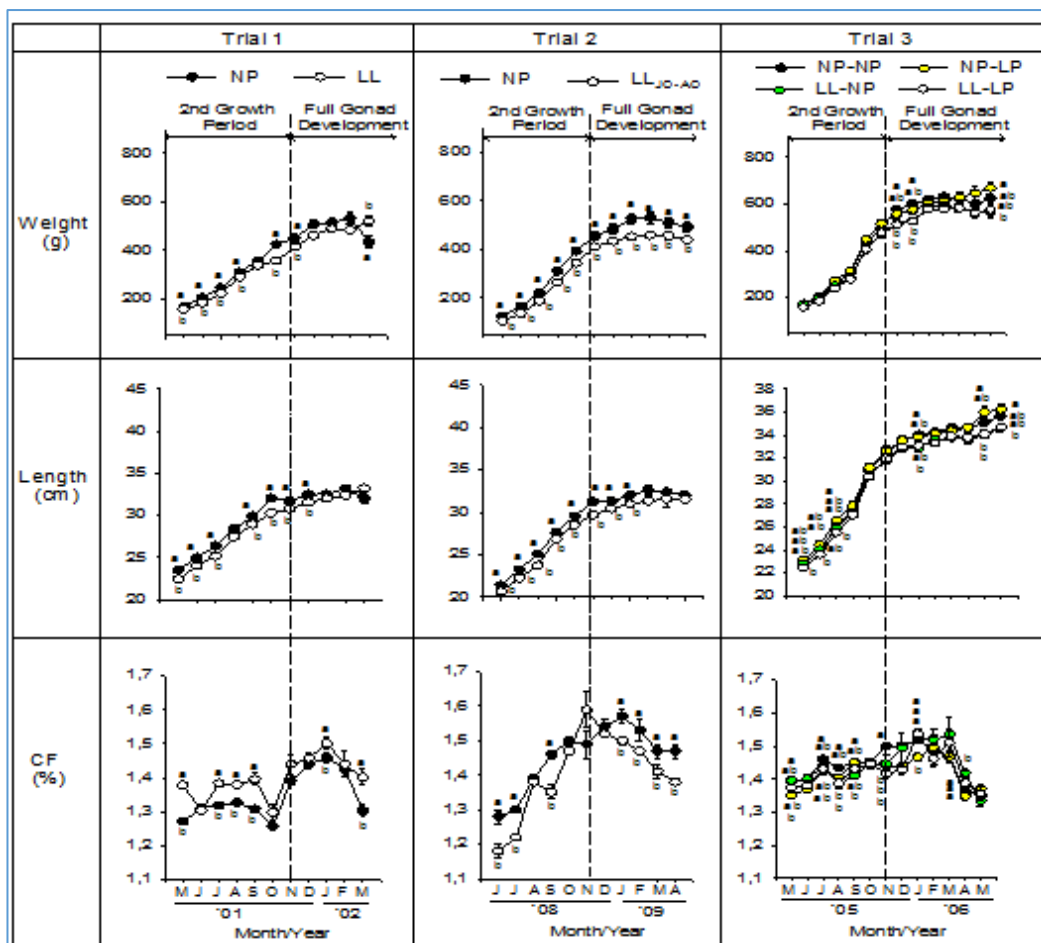


Figura 6.2. Monthly changes in mean (\pm SEM) body weight (A, D, G), fork length (B, E, H) and condition factor (C, F, I) during the second annual cycle for male sea bass kept under the different photoperiod regimes described in Figure 1. Dotted lines divide this cycle into two different periods, one of active somatic growth (May-June to November) and one of reduced growth (November to April-May), at which time male sea bass are known to reach puberty (i.e., the period of full gonadal development). Significant differences ($P < 0.05$) between photoperiod treatments for the same month are indicated by asterisks in T1 and T2, and different letters in T3. Arrows indicate a potential growth enhancement.

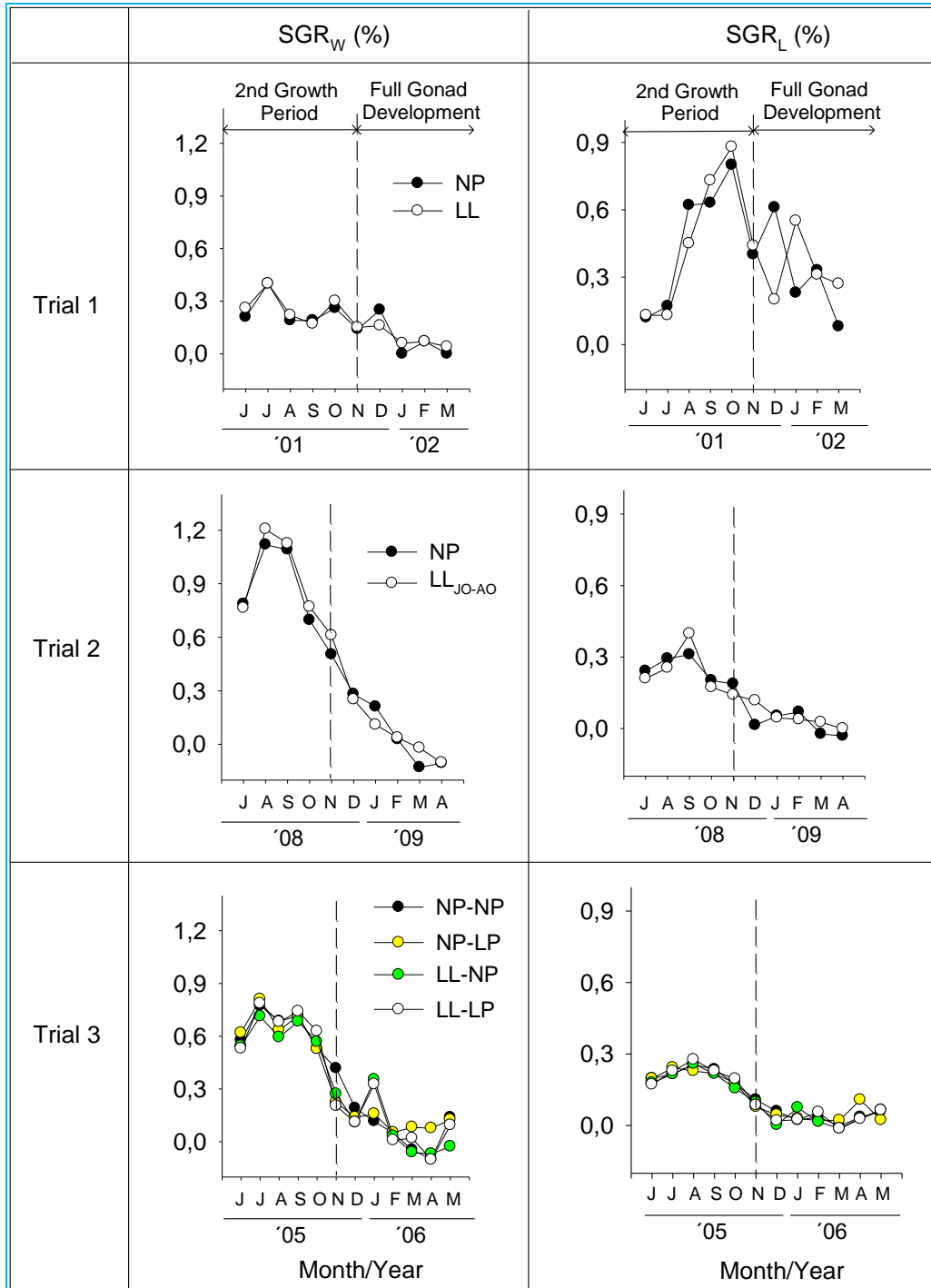


Figura 6.3. Specific growth rates for body weight (GW) (A, C, E) and fork length (GL) (B, D, F) during the second annual cycle for male sea bass kept under the different photoperiod regimes described in Figure 6.1. Dotted lines divide this cycle into two different periods as explained in Figure 6.2. Data are expressed as mean values for each experimental group. Arrows indicate a potential growth enhancement.

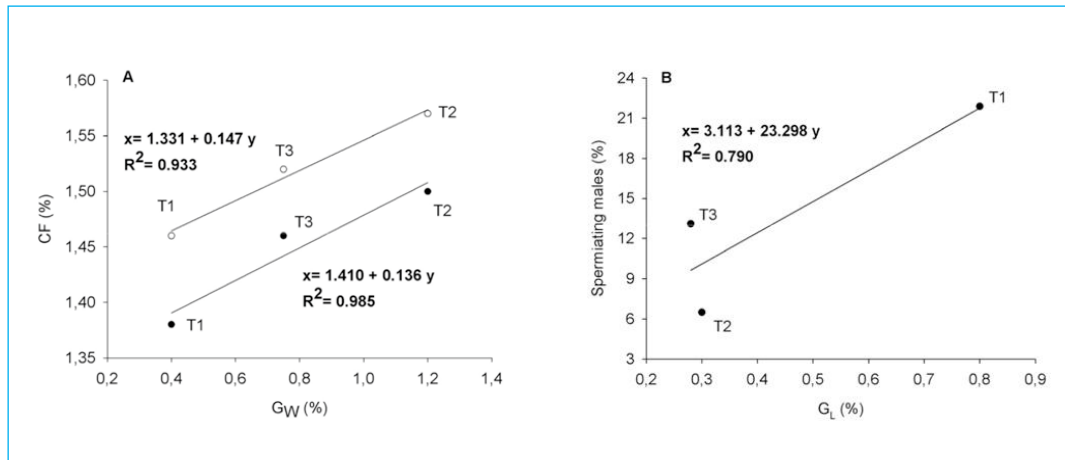


Figura 6.4. (A) Linear regression of male sea bass condition factor (CF) versus specific growth rate for weight (GW) during the second year growth period (black circles) and full gonadal development (white circles). (B) Linear regression of male sea bass rate of precocity versus specific growth rate for length (GL) during the second year. Data points are taken from all three trials (T1, T2 and T3), taking into account the maximum values recorded in the control groups (NP in T1 and T2 and NP-NP in T3) for each variable.

Gonadomatic Index

Monthly changes in GSI values for the NP and LL groups in T1 were seen from November to March during the second annual cycle (Figure 6.5A). In November and December, GSI was similar in both groups. The first significant GSI increase in the NP group occurred in January and February, when it reached values >4.7%, only to slowly decrease in March. The LL group had significantly lower values than the NP group in January (3.45%) and February (3.75%), and proceeded to slowly decrease in March. GSI values for the NP-NP group in T3 were high in March, and slowly decreased in April and May (Figure 6.5B). A similar pattern of variation was observed in the LL-NP group. The NP-LP group had a GSI of 1.66% and 3.38% in March and April, respectively, which then decreased in May to 0.75%. The LL-LP group also showed high values in March and April (2.76-2.71%) that again decreased in May (0.90%). Of note, both groups kept under LP conditions (i.e., NP-LP and LL-LP) during the second annual cycle showed the highest GSI values in April, at which time the GSI of the NP-NP and LL-NP groups had already started to show a progressive decrease. No data were recorded in T2.

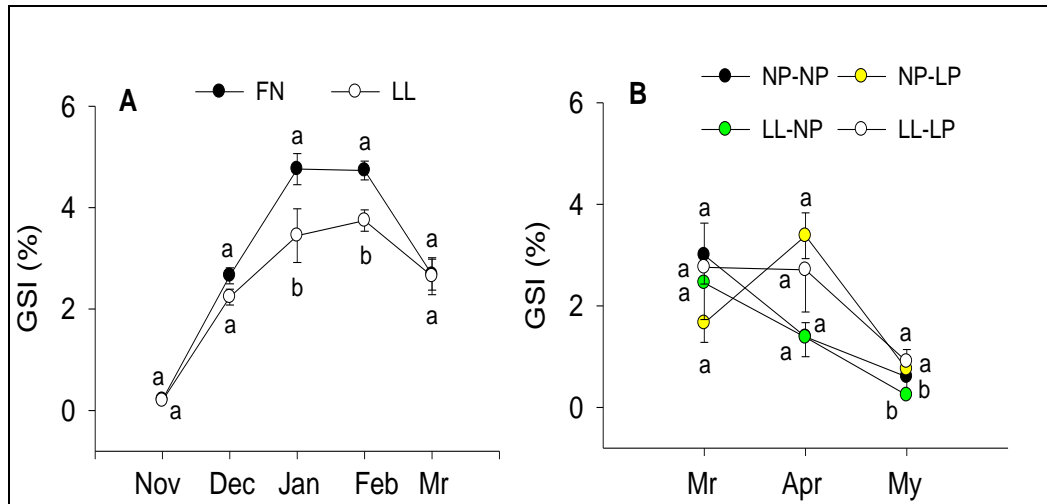


Figura 6.5. Monthly changes in gonadosomatic index (GSI) mean (\pm SEM) values during the second annual cycle of life of male sea bass kept under different photoperiod regimes in trial 1 (A) and trial 3 (B). Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) between photoperiod treatments in the same month. See Figure 1 for details on the light regimes used.

Spermiation rate

The percentage of running males in all three trials during two consecutive annual cycles is depicted in Fig. 6.6. The highest GL values, which were seen in T1, correlated with high rates of precocity, while the lower GL values seen in T2 and T3 were associated with lower rates of precocity. A regression line was calculated to estimate the increase in the rate of spermiating males based on the fish GL; there was a strong association between both variables as indicated by the determination coefficient ($R^2 = 0.790$) (Figure 6.4B). The percentage of precocious males during the first annual cycle was high in February (21.89%) in the NP group of T1, but steadily decreased in March (14.69%) and April (2.63%) (Figure 6.6A). The LL group showed a very low rate of running fish in March (3.32%) and April (2.25%). These results greatly differ from the percentages obtained during the second annual cycle for both the NP and LL groups, which exhibited a similar rate of spermiating fish from November to March, although it should be noted that generally higher rates of spermiation were recorded for the NP group as compared to the LL group (Figure 6.6B). In this manner, the percentage of maturing males increased throughout this period, peaking in February for both the NP (100%) and LL (95.65%) groups, and remaining high until March (100% and 92%, respectively, $P < 0.05$) (Figure 6.6B). In T2, the percentage of precocious males in the NP group

was as low as 6.5% in February, while no running fish were observed in the LLJO group at this sampling point of the first annual cycle (Figure 6.6C). On the other hand, the percentages obtained during the second annual cycle (November-May) for both the NP and LLJO-AO groups were similar, although as was the case in T1, significantly higher rates of spermiation were also recorded in T2 for the NP versus the LLAO (LLJO-AO) group (Figure 6.6D). Likewise, the highest percentage of spermiating males for both the NP (95.56%) and LLJO-AO (83.51%) groups was attained in February, and was maintained from March to May in both groups. Finally, the NP group of fish in T3 exhibited the highest percentage of precocious males in March (13.10%), and the lowest percentage in June (0.90%) during the first annual cycle, while a very low rate of running males was observed in the LL group from February to June (0%, 3.15%, 1.30%, 1.90%, 0%, respectively) (Figure 6.6E) ($P < 0.05$). This greatly contrasted with the percentages (March-May) obtained during the second annual cycle (Figure 6.6F). Of note, the NP-NP and LL-NP groups displayed the highest percentage of spermiating males (100%) in March-April and April, respectively, while this rate decreased to 12.50% in May for both groups. In the two groups kept under LP conditions during the second annual cycle, the highest percentages of spermiating males (100%) were found in April. Interestingly, the rates of spermiating fish in May were as high as 62.50% in the NP-LP group and 100% in the LL-LP group, in stark contrast with the low percentages (12.50%) observed in the NP-NP and LL-NP groups during the same period. These findings show that gonadal maturation in fish exposed to LP was delayed with respect to those kept under natural photoperiod (control) conditions ($P < 0.05$) throughout the second annual cycle.

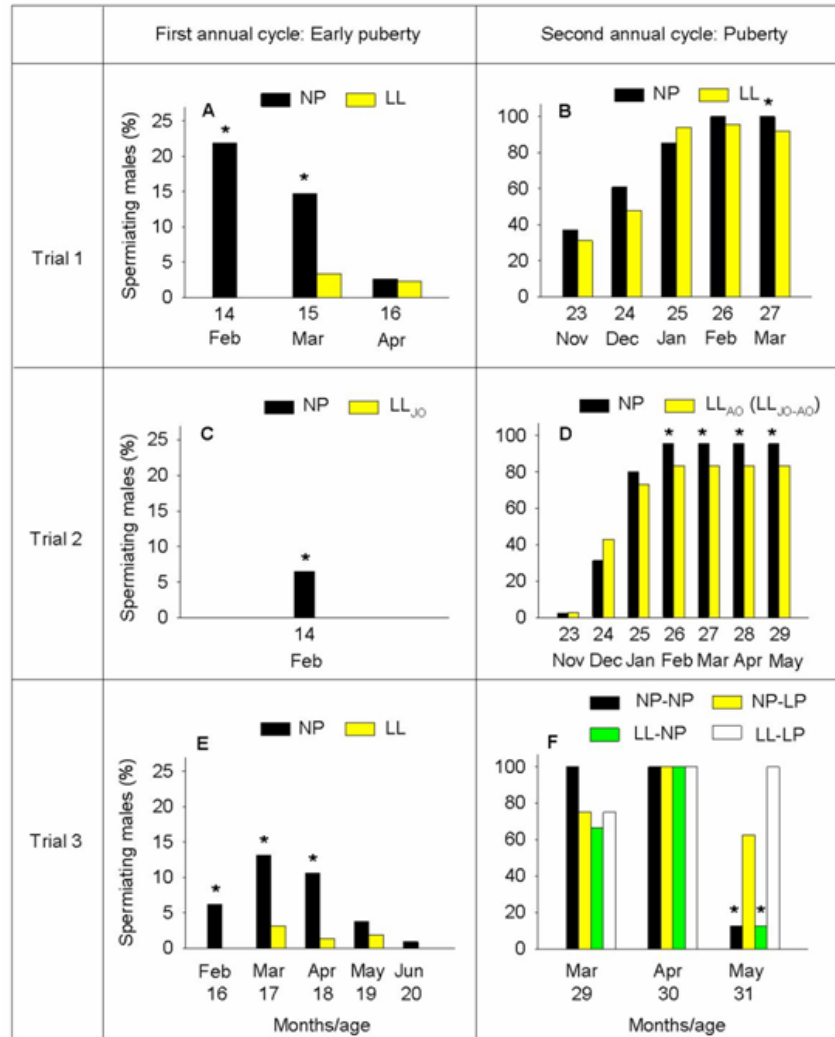


Figura 6.6. Percentage of running sea bass males (as assessed by stripping) kept under the different photoperiod regimes described in Figure 6.1, during the first (A, C, E) and second annual reproductive cycles (B, D, F). The light regime references are explained in Figure 6.1. Asterisks indicate differences between different light regimes in the same month.

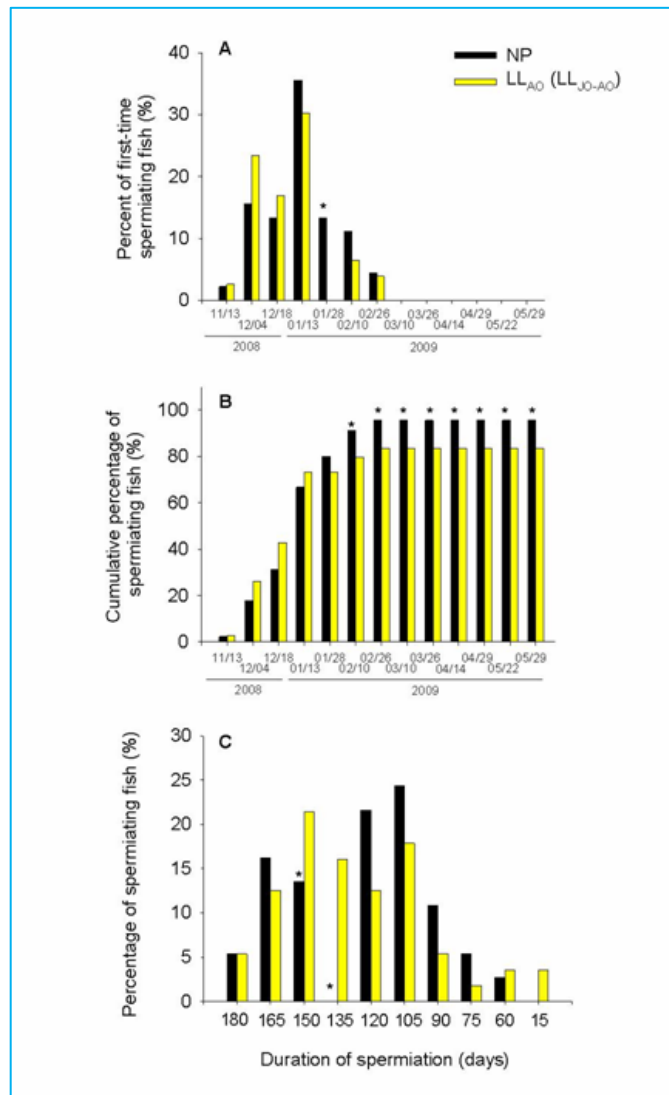


Figura 6.7. Traits of the maturation process in male sea bass during the second annual cycle. . (A) Percentage of males (as assessed by stripping) that started running from mid-November to the end of February. (B) Cumulative percentage of fish spermating from November to February that remained spermating until the end of the spawning period (May). (C) Duration of spermiation in sea bass previously kept under different photoperiod regimes (Trial 2). The light regime references are explained in Figure 6.1. Data are expressed as mm-dd-year. Asterisks indicate differences between different light regimes in the same month.

Duration of spermiation in males

In T2, a low percentage of males in both the NP (2.2%) and LLAO (LLJO-AO) (2.60%) groups began to release sperm from mid-November on, and the highest percentages of running males were observed at mid-January (35.53% and

30.26%, respectively). At later sampling points, this percentage decreased in both groups, with the LLAO (LLJO-AO) group exhibiting the lowest values. Males that released sperm for the first time during the second annual cycle after gentle stripping were still found in both groups at the end of February (4.44% and 3.90% in NP and LLAO (LLJO-AO), respectively) (Figure 6.7A). These results were used to calculate the cumulative percentage of spermiating fish (Figure 6.7B). The results showed that male sea bass had a rather long reproductive season, with a very low rate of fish spermiating early in November and a steady and progressive increase in the cumulative percentage from December to the end of February (95.56% in NP and 83.51% in LLAO group). Constant elevated values were maintained in the following months, until the end of May (Figure 6.7B). This would indicate that sea bass males were actively spermiating for around 5.9 months. We also observed a few males which started to spermiate at the end of February, i.e., 3.3 months later than those that started in November. Spermiation in the NP and LLAO (LLJO-AO) groups of fish lasted from 15 to 180 days, with an average span of 124 days in the NP group and 127 days in the LLAO (LLJO-AO) group (Figure 6.7C)

Discussion

This paper examined the effect of combining different photoperiod regimes on sexual maturation and growth performance of male sea bass during the first two years of life. Accordingly, our results demonstrate that exposing underyearling male sea bass to ambient seasonal temperatures and LL regimes for either 12 consecutive months (T1 and T3) or during the summer-early autumn period (i.e., from June to October; T2) of the first annual cycles equally effective for reducing the numbers of precocious fish. These LL treatments are just as efficient as those previously applied by Begtashi et al. [11], who used a 12-month exposure to LL, and Felip et al. [20], who studied 4-16 and 6-month exposures before and during gametogenesis, respectively. Moreover, the present data are in accordance with the existence of a photolabile period in sea bass that includes the month of September, during which time the application of LL reduces the number of prepubertal males that successfully carry out the process of gametogenesis [21]. In fact, it is known that exposure to LL outside this photolabile period fails to prevent the presence of precocious males, as the administration of LL from October to November during the first year of life had no effect on the percentage of precocious

males as compared to the simulated natural photoperiod [21]. Altogether, this suggests that successful reduction in the occurrence of precocious males would depend on the time of the year when the underyearling fish are exposed to a specific photoperiodic signal [17, 24]. In our study, exposure to LL drastically reduced the percentage of precocious males in all three trials, reaching levels below 3%, whereas in the control groups these levels were as high as 13-22% (see also Carrillo et al. [5, 9]). However, it is interesting to note that differences in the rate of precocious males were also evident among the control groups of different trials. In this study, the maximum rate was recorded in T1, followed by T3 and T2. The study by Rodríguez et al. [21] hypothesized that populations with larger-size males would also exhibit higher rates of precocity. Our data would support this idea, as T1 groups had both larger fish (GL) and higher rates of precocious fish than T3 and T2 groups (21.89%, 10.60% and 6.5%, respectively).

In contrast to the clear reduction in precocious males observed under LL conditions during the first annual cycle of life this study [11, 20, 21], the LL treatment had no effect on gonadal maturation during the second annual life cycle of the animals. Consecutive administration of LL treatments (T1 and T2) in year two failed to influence the phase of the spermiation rhythm as compared to NP, and the rate of running males increased along with the seasonal profile of GSI (T1), which peaked in February, a crucial month in terms of the reproductive performance of this species [9]. However, significantly lower percentages of running males and lower GSI values were observed in LL groups, suggesting that LL regimes administered throughout the most sensitive photolabile period during the first and second annual cycles reduced the amplitude of the spermiation rhythm with respect to the maximal levels attained under NP. On the other hand, when the rate of spermiation for the NP group was compared to that of the LLA-O (LLJO-AO) group (T2), no differences were found in the time when males began spermiating during the second annual cycle. Sea bass milt obtained by means of a gentle abdominal massage was first registered in mid-November, and the highest number of males releasing sperm for the first time was observed in January, followed by a reduction at the end of February. From this moment on, males were able to continue spermiating until the end of May. Of note, the cumulative percentage of spermiating fish attained maximum levels in February, and was maintained for three more months. Accordingly, spermiation may last for as long as 6 months (i.e., from mid-November to May), with an average duration of 124-

127 days in this study. These observations are within the range of values reported for European sea bass, which is a group synchronous spawner and has a rather long spawning season, with males actively spermiating for up to 5-6 months [9, this study], which ensures the fertilization of gametes throughout the entire reproductive season. Altogether, these data demonstrate that LL regimes do not drastically alter gonadal development in 2-year-old male sea bass, suggesting that adult males might have acquired a previous potential competence to reproduce that is independent of the photoperiod history, including inhibitory treatments of gametogenesis. This provides further evidence of an endogenous mechanism responsible for reproduction in this species [9, 15]. In contrast, in 2-year-old Atlantic cod, continuous artificial lighting in combination with shading suppresses sexual maturation [8]. This indicates that different fish species behave differently, and thus the efficacy of artificial day length treatments needs to be tested for each particular species. On the other hand, our study has also explored the effects of exposure to LP on delaying gonadal maturation and enhancing growth during the second annual cycle. The present results (T3) confirm those of Rodríguez et al. [17], demonstrating that LP induces a delay in both the time of maximum spermiation and testicular growth. In the present study, LP altered the phase of the spermiation rhythm, which peaked from April on, and of GSI, which also reached maximum values in April, without affecting the amplitude of these rhythms. It should be noted that sperm quality was not evaluated in the present study, and this particular aspect would require more detailed investigation. Previous work on the application of constant long days during two consecutive years resulted in a reduction of fecundity and egg quality in female sea bass, as the result of a mismatch between inappropriate environmental cues (i.e., a long photoperiod and low temperature during the reproductive period) that altered the hormonal reproductive cascade [13, 14]. It is known that artificial environmental situations can cause a dysfunction affecting the synthesis of estrogen and the rates of vitellogenesis and atresia, resulting in reduced quality of the progeny. In this regard, nothing is known about the effect of the discrepancy between the photoperiod and the temperature on testicular steroidogenesis and sperm quality. More detailed studies are therefore needed to explore the effects of the relationship between photoperiod and temperature on these aspects [13, 17].

Finally, we observed that males kept under continuous light in year two had a significantly lower weight and length than control animals, as previously

described for male sea bass kept under the same light conditions during the first year [11]. On the other hand, Felip et al. [20] failed to find any differences in the evolution of somatic growth in 1-year-old animals that received NP or LL treatments. Thus, differences in growth among distinct populations illustrate that, in addition to the photoperiod, genetic differences and other environmental factors, such as temperature, may play a role and even interact with the photoperiod to affect growth performance [11, 13, 17]. Nevertheless, the occurrence of a full gonadal development period in year two, coinciding with a period of reduced growth, might explain why fish size (at least in terms of length) in the LL groups is equal to or even larger than that of fish in the control group. These findings support the idea that LL treatments during year two do not impair the reproductive competence of animals that reach puberty, as the allocation of energy among maintenance, growth and reproductive tasks takes place. Interestingly, this study shows that continuous long-day exposure in year two (i.e. NP-LP, LL-LP) results in a slight increase in growth, both in terms of weight and length, with respect to fish kept under NP-NP and LL-NP conditions, providing a potentially beneficial effect for fish farming. Moreover, our data show that the fish were larger (GW) in T2 than in T3 or T1, and also exhibited higher condition factor values. This might be attributed to the fact that fish of different size must satisfy different demands (i.e., growth, gonadal development, swimming activity, etc.), which thus affects their corpulence. These findings are in line with previous studies that considered the effect of long-day regimes lasting two [7] or three [13] consecutive years on the enhancement of somatic growth in male sea bass. We have shown that, at the time of incipient gonadal development (year one), fish exposed to LP display a greater amplitude annual GSI profile than those exposed to NP, as well as a one-month delay in gonadal maturation. During full gonadal maturation (year two in this study), the annual GSI profile of LP fish was shifted by one month with respect to that of the NP group. This is associated with a phase delay and increased amplitude of the annual rhythms of some key reproductive hormones, such as the pituitary gonadotropin releasing hormone (sbGnRH) and the plasma levels of luteinizing hormone (Lh) and 11-ketotestosterone (11-KT) [7]. Altogether, these endocrine changes are likely to affect LP fish gonadal development, which occurs later than in NP fish, and as a result, potentially favor somatic growth. In summary, the present study, conducted by means of three independent trials on a laboratory scale, demonstrates that continuous light administered during year one over a 12-month period, or a shorter time interval that includes the sensitive photolabile

period (September), significantly reduces precocious maturation in yearling European sea bass males. The shorter treatment may have the added advantage of reducing the stress provoked by long-term exposure to LL. In contrast, LL does not prevent maturation at year two, supporting the existence of an endogenous rhythm for reproduction in sea bass [25]. Furthermore, the administration of LP in year two delays maturation (i.e., shifts the peaks for GSI and the percentage of spermiating males from March to April, regardless of the photoperiod treatment used in year one), modifies the annual rhythms of some key hormones [7] and enhances the potential growth of fish [17, this study]. We also examined the duration of spermiation and observed that fish may actively spermiate for up to 6 months (mid November-May), with an average duration of 124-127 days. Finally, the close associations between specific growth rate in terms of length and the rate of precocity, and specific growth rate in terms of weight and corpulence observed in this species might be considered to be biological performance indicators for reared stock. Accordingly, the effect of combining continuous and long lighting on the control of sexual maturation under indoor rearing conditions might have potential commercial applications, thus improving productivity and reducing farm operating costs. In this vein, further studies are needed to verify the appropriateness of environmental treatments in the transition from a laboratory setting to outdoor conditions.

Acknowledgement

The authors wish to thank C. Marín and X. Simó for their technical assistance in rearing and sampling the fish. The work of the authors in this article was supported by UE projects Q5RS-2002-01801 (PUBERTIMING) and Grants AGL2006-04672 (PUBERCONTROL) and CSD2007-00002 (AQUAGENOMICS) from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN), Grant-201340I005 (PUBERBASS) from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness and PROMETEO/2010/003 and PROMETEOII/2014/05 (Generalitat Valenciana). RR was supported by a FPI fellowship from the MICINN (Spain).

References

1. Bromage N, Porter M, Randall C (2001) The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197: 63-98.
2. Hulata G (2001) Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* 111(1): 155-173.
3. Zanuy S, Carrillo M, Felip A, Rodríguez L, Blázquez M, et al. (2001) Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 202(3-4): 187-203.
4. Migaud H, Davie A, Taylor JF (2010) Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. *J Fish Biol* 76 (1): 27-68.
5. Carrillo M, Zanuy S, Felip A, Bayarri MJ, Molés G, et al. (2009) Hormonal and environmental control of puberty in perciform fish. The case of sea bass. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology: Annals of the New York Academy of Sciences* 1163: 49-59.
6. Taranger GL, Carrillo M, Schulz RW, Fontaine P, Zanuy S, et al. (2010) Control of puberty in farmed fish. *General Comparative Endocrinology* 165(3) 483-515.
7. Carrillo M, Begtashi I, Rodríguez L, Marin MC, Zanuy S (2010) Long photoperiod on sea cages delays timing of first spermiation and enhances growth in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 299(1-4): 157-164.
8. Cowan M, Davie A, Migaud H (2011) The effect of combining shading and continuous lighting on the suppression of sexual maturation in outdoor-reared Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Aquaculture* 320(1-2): 113-122.

9. Carrillo M, Zanuy S, Prat F, Cerdá J, Ramos J, et al. (1995) Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: Broodstock Management and Egg and Larval Quality by Bromage NR & Roberts RJ (Eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK, pp. 138-168.
10. Saillant E, Fostier A, Menu B, Haffray P, Chatain B (2001) Sexual growth dimorphism in sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture* 202: 371-387.
11. Begtashi I, Rodríguez L, Molés G, Zanuy S, Carrillo M (2004) Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). I. Morphological aspects. *Aquaculture* 241: 539-559.
12. Felip A, Zanuy S, Carrillo M (2006) Comparative analysis of growth performance and sperm motility between precocious and non-precocious males in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture* 256: 570-578.
13. Zanuy S, Carrillo M, Ruiz F (1986) Delayed gametogenesis and spawning of seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) kept under different photoperiod and temperature regimes. *Fish Physiology and Biochemistry* 2 (1-4): 53-63.
14. Zanuy S, Prat F, Carrillo M, Bromage NR (1995) Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17 β -oestradiol levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources* 8, 147-152.
15. Prat F, Zanuy S, Bromage N, Carrillo M (1999) Effects of constant short and long photoperiod regimes on the spawning performance and sex steroid levels of female and male sea bass. *Journal of Fish Biology* 54(1): 125-137.
16. Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Shaw M, Carrillo M (2001a) Changes in plasma levels of reproductive hormones during first sexual maturation in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under artificial day lengths. *Aquaculture* 202: 235-248.

17. Rodríguez L, Zanuy S, Carrillo M (2001b) Influence of day length on the age at first maturity and somatic growth in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture* 196: 159-175.
18. Rodríguez L, Carrillo M, Sorbera LA, Zohar Y, Zanuy S (2004) Effects of photoperiod on pituitary levels of three forms of GnRH and reproductive hormones in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during testicular differentiation and first testicular recrudescence. *Gen Comp Endocrinol* 136(1): 37-48.
19. Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M (2005) Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.): hormonal aspects. *General Comparative Endocrinology* 140: 116-125.
20. Felip A, Zanuy S, Muriach B, Cerdá-Reverter JM, Carrillo M (2008) Reduction of sexual maturation in male *Dicentrarchus labrax* by continuous light both before and during gametogenesis regimes. *Aquaculture* 275: 347-355.
21. Rodríguez R, Felip A, Cerqueira V, Hala E, Zanuy S, et al. (2012) Identification of a photo-labile period to reduce sexual maturation in juvenile male sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by continuous light regime. *Aquaculture International* 20(6): 1071-1083.
22. Barnabé G (1995) The sea bass. In: *Production of aquatic animals* CE Nash & AJ Novotny (Eds.), Elsevier, Oxford, UK, pp. 269-287.
23. Sokal RR, Rohlf FJ (1981) *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research* (2nd edn), W.H. Freeman, USA, pp. 859.
24. Scott AP, Baynes SM, Skarphéðinsson O, Bye VJ (1984) Control of spawning time in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, using constant long day lengths. *Aquaculture* 43: 225-233.
25. Carrillo, M., Espigares, F., Felip, A., Escobar, S., Molés, G., Rodríguez, R., Alvarado, M.V., Gómez, A. y Zanuy, S. (2015) Updating control of puberty in

male European sea bass: a holistic approach. Gen. Comp. Endocrinol. 221:
42-53.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La pubertad prematura es una condición que suele manifestarse en muchas especies de peces de interés acuícola cuando son criadas en condiciones intensivas (Taranger et al., 2010). Como ya se ha mencionado, en el caso de la lubina su manifestación en los sistemas de engorde afecta a una gran proporción de individuos machos, trayendo consigo una disminución de la rentabilidad de las empresas dedicadas a su cultivo (Carrillo et al., 1995, 2015). Si además tenemos en cuenta que las hembras presentan tasas de crecimiento mayores que la de los machos, una población mayoritariamente de machos sería menos eficiente (Carrillo et al., 1995, 2015). Este inconveniente ha motivado la búsqueda de estrategias destinadas a evitar la aparición de la precocidad en los sistemas de cría intensiva de peces, de hecho, la maduración precoz en teleósteos se puede controlar mediante la manipulación genética, endocrina, ambiental, nutricional y comportamental (Taranger et al., 2010). No obstante, cada estrategia tiene sus ventajas y desventajas según la especie, pudiendo incluso tener limitaciones desde un punto de vista comercial y/o sanitario. Por ejemplo, en el caso de la pubertad anticipada de los individuos machos de lubina una solución sería obtener generaciones de individuos hembras o individuos estériles de tipo XXX. Sin embargo, esto no siempre resulta fácil ya que la determinación sexual de esta especie es polifactorial (Vandeputte et al., 2007) lo que también causa que existan distintas proporciones de individuos machos y hembras entre poblaciones. En el caso de las estrategias endocrinas que consisten en aplicar esteroides sexuales durante el proceso de diferenciación sexual, para producir individuos de fenotipo hembra, las normativas son cada vez más rigurosas en cuanto al empleo de hormonas en la producción animal, además, desde un punto de vista del consumidor, hay una tendencia que va en aumento, a no demandar animales manipulados hormonalmente (Carrillo et al., 2009a). En cuanto a las estrategias de alimentación, basadas en la administración de dietas restrictivas, se pretende que los peces no alcancen el umbral energético necesario para iniciar su pubertad durante el periodo crítico (Sasayama y Takahashi, 1974; Berglund, 1992,1995; Karlsen et al., 1995; Trombley et al., 2014). No obstante, este tipo de alternativas no siempre dan los resultados deseados (Bromley et al., 2000) dado que periodos largos de restricción de alimento pueden provocar una reducción dramática del crecimiento como se ha observado en la lubina (Escobar et al., 2014) y por ende ocasionar que los individuos no alcancen su talla comercial en el tiempo esperado,

viéndose afectado igualmente el rendimiento de las empresas piscícolas e incluso el bienestar de los peces (Karlsen et al., 1995; Noble et al., 2007, 2008). Por el contrario, la manipulación del fotoperiodo, ha demostrado ser una herramienta eficaz para retrasar, adelantar o incluso reducir la maduración sexual en especies de mares templados (Bromage et al., 2001). Específicamente, en la lubina los regímenes de luz continua aplicados durante periodos largos de tiempo reducen significativamente la pubertad prematura como se ha demostrado en los trabajos de Begtashi et al. (2004) y Felip et al. (2008). No obstante, se sabe que este tipo de tratamientos no siempre son rentables ni ofrecen una implementación fácil de cara a las empresas acuícolas, algunas de ellas ubicadas en mar abierto. Además, la administración de luz continua durante periodos de tiempo prolongados pueden comprometer la salud y bienestar de los peces (Giannetto et al., 2014) provocando un aumento en plasma de cortisol como se ha observado en la lubina, bacalao (Vera y Migaud., 2009) y trucha arcoíris (Leonardi y Klempau., 2003) o incluso provocar problemas de degeneración de la retina en los animales (Vihtelic y Hyde, 2000; Allison et al., 2006; Vera y Migaud., 2009). Asimismo, varios estudios han mostrado también el espectro de luz puede afectar el sistema inmune de los peces (Bairwa et al., 2017; Choe et al., 2017; Baekelandt et al., 2019). Es por esto que, los estudios desarrollados en la presente tesis aportan un mejor conocimiento en el control de la pubertad anticipada de la lubina ya que se ha logrado reducir el periodo de aplicación de luz continua de 4 meses y 6 meses previamente desarrollado por Felip et al. (2008) a tan sólo 1 mes de duración, lo que puede suponer una alternativa de manejo más factible de implementar en las empresas de engorde de lubina. Además, cabe resaltar que los resultados obtenidos en la presente tesis, confirman que ciertos parámetros como el IGS, porcentaje de espermiación, porcentajes de individuos en estados avanzados de desarrollo gonadal y el nivel en plasma de 11-KT, son buenos indicadores del desarrollo gonadal y del proceso espermatogénico en esta especie, y que resultan afectados significativamente por los regímenes de luz continua, lo que concuerda con resultados previos descritos en la lubina (Begtashi et al., 2004; Rodríguez et al., 2005; Felip et al., 2008) y en otras especies como por ejemplo, el turbot (*Psetta máxima*) (Imsland et al. 1997), perca euroasiática (Migaud et al. 2003, 2004), tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Rad et al. 2006), abadejo (*Melanogrammus aeglefinus*) (Davie et al. 2007a), bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*) (Davie et al. 2007b; Almeida et al. 2009) y lucioperca (*Sander lucioperca*) (Ammar et al., 2015). Por lo tanto, la metodología y las variables analizadas para localizar el

periodo en la lubina, podrían servir como un método práctico con fines de controlar la maduración precoz en otras nuevas especies que tengan un potencial en acuicultura como por ejemplo el bacalao del atlántico (Imsland et al., 2013), trucha alpina (Liu y Duston, 2016; 2018) o el lumpo (*Cyclopterus lumpus*) (Imsland et al., 2018). En este sentido, es importante destacar que, en general, los valores de 11-KT, una hormona considerada clave en el proceso espermatogénico en peces (Schulz et al., 2010), son más bajos en aquellos grupos donde la precocidad es menor. Por lo tanto, estos resultados refuerzan la idea de que este andrógeno es crítico para el inicio de la pubertad en la lubina (Rodríguez et al., 2005) y también apoya la hipótesis que sugiere la existencia de un umbral de esta hormona como posible activador de la pubertad prematura en esta especie (Carrillo et al., 2015; Espigares et al., 2015b). Los valores plasmáticos bajos de 11-KT observados en los grupos con una menor incidencia de precocidad apoyan la idea de que esta hormona podría servir como un marcador no letal del inicio de la pubertad, lo que permitiría, por ejemplo, separar peces precoces de no precoces como se ha sugerido en el trabajo de Blázquez et al. (2017). Por otro lado, los mecanismos a través de los cuales la luz afecta al proceso reproductor en teleósteos no se conocen y existen pocos estudios de los efectos de la luz continua sobre el eje endocrino cerebro-hipófisis-gónada. Por estas razones, la presente tesis ha intentado obtener nueva información acerca de cómo este tipo de tratamientos fotoperiódicos alteran el ritmo y/o la amplitud de ciertos factores implicados en el proceso de la maduración gonadal en peces. En este sentido, se ha demostrado que la aplicación de LL durante el periodo fotosensible es capaz de disminuir el contenido y la expresión de algunas de las principales hormonas reproductivas claves para el desarrollo gonadal en teleósteos.

Los niveles bajos de expresión observados durante el periodo fotosensible de la sbGnRH-I, apoyan la idea de que esta hormona es la forma hipofisiotrópica en la lubina (Rodríguez et al., 2001b), como ocurre en otras especies de teleósteos en las que esta forma está presente (Okubo y Nagahama, 2008; Zohar et al., 2010; Ohga et al., 2018). Por otro lado, aunque en peces se considera que la cGnRH-II y la sGnRH-III parecen intervenir más en mecanismos regulatorios de la conducta reproductiva y alimentaria (Abe y Oka, 2011; Marvel et al., 2018) o de la transducción y transmisión de los cambios estacionales percibidos por la glándula pineal (Servili et al., 2010), en la presente tesis se demostró por primera vez que el contenido de cGnRH-II resulta también alterado por la LL durante el periodo

fotolábil en la lubina, lo que sugiere que esta hormona podría tener un papel hipofisiotrófico durante el proceso de maduración sexual de esta especie, una función que se ha sugerido también en especies como el espinoso (*Gasterosteus aculeatus*). Además, los resultados obtenidos constatan que la LL disminuye los niveles de expresión de *fsh β* en la hipófisis durante el periodo fotosensible, lo cual podría ser una consecuencia directa del efecto depresor de la LL sobre el contenido de sbGnRH en dicho periodo. A este respecto, en la lubina existen estudios que sugieren que esta hormona regula la secreción de gonadotrofinas, al menos durante el periodo de diferenciación gonadal (Rodríguez et al., 2000; Moles et al., 2007). No obstante, los resultados obtenidos evidencian una falta de concordancia entre los niveles de expresión de *fsh β* y los niveles plasmáticos de Fsh, lo cual es contrario a lo observado en otras especies como los salmónidos, donde el aumento de los transcritos de *fsh β* es coincidente con un contenido alto de Fsh en la hipófisis y a nivel plasmático (Gómez et al., 1999; Dickey y Swanson, 2000; Swanson et al., 2003). Por lo tanto, estos resultados refuerzan la idea de que los mecanismos regulatorios de síntesis y liberación de esta hormona son diferentes en lubina, como ya se ha sugerido en estudios anteriores (Molés et al., 2007). Sin embargo, la disminución observada en los niveles plasmáticos de Fsh durante el periodo fotolábil y la baja precocidad de los individuos, sugiere que en la lubina, al igual que lo observado en otras especies de teleósteos como en la seriola aleta amarilla (Higuchi et al., 2017), la Fsh puede estar jugando un papel importante en etapas tempranas del desarrollo gonadal, bien sea activando la producción de esteroides gonadales o regulando genes muy importantes para el comienzo de la espermatogénesis como ha sido propuesto por Sambroni et al. (2013). De hecho, experimentos *in vivo* en lubina han demostrado que la Fsh, pero no la Lh, es capaz de activar la espermatogénesis en individuos inmaduros (Mazón et al., 2014), promover la proliferación de células germinales, los niveles plasmáticos de 11-KT y regular genes involucrados en el proceso espermatogénico (Mazón et al., 2014, 2015). Por otro lado, otro hallazgo importante fue la disminución significativa de los niveles plasmáticos de estradiol observada durante el periodo fotolábil, hecho éste que concuerda con un estudio reciente efectuado en la lucioperca, donde la LL fue capaz de disminuir los niveles de esteroides, incluidos el E₂ (Ammar et al., 2015). Aunque el estradiol es una hormona típicamente femenina, diferentes estudios realizados en peces, indican que los niveles de estradiol son elevados en el inicio o durante la espermatogénesis (Miura et al., 1999; Amer et al., 2001; Chaves-Pozo et al., 2007;

Degani, 2015, Maldonado-García et al., 2018; Passini et al., 2019). De hecho, se ha sugerido su participación en etapas iniciales de la espermatogénesis, durante la que se podría promover la expresión de genes implicados en el desarrollo gonadal (Schulz et al., 2010) y la proliferación de células germinales (Miura et al., 1999). En consecuencia, los resultados obtenidos en la lubina son, inicialmente, muy importantes porque sugieren que esta hormona podría estar participando en el desarrollo gonadal de esta especie, probablemente promoviendo la proliferación espermatogonial, dado que el número de mitosis espermatogoniales observadas es bajo en aquellos momentos muestrales donde el estradiol disminuyó en los animales sometidos a LL. Otro de los hallazgos importantes en la presente tesis fue la disminución de la expresión de la hormona antimulleriana en el grupo control durante el periodo fotolábil, mientras que su expresión aumentó en los grupos sometidos a LL. La Amh está implicada en la supervivencia y la proliferación de las células germinales (Adolfi et al., 2019) y podría estar controlando el balance entre la proliferación y diferenciación de las células germinales, actuando de forma cooperativa con otros factores producidos tanto en las células germinales como en las de Sertoli (Lin et al., 2017). En la lubina se ha mostrado que la expresión de *amh* puede evitar el avance de la espermatogénesis (Mazón et al., 2014; Rocha et al., 2016; Blázquez et al., 2017), probablemente evitando la diferenciación de las espermatogonias como ocurre en el pez cebra (Skaar et al., 2011). No obstante, los mecanismos a través de los cuales la Amh puede estar regulada e intervenir en el proceso espermatogénico en peces todavía está por esclarecer. En algunas especies se ha demostrado que existe un efecto inhibitorio por parte de los andrógenos (Miura et al., 2002; Gonzalez et al., 2015) y de los estrógenos sobre su expresión. Sin embargo, en la lubina está todavía por corroborar. No obstante, los niveles bajos de 11-KT y E₂ observados durante el periodo fotolábil sugieren que, de existir un efecto inhibitorio de estas hormonas sobre la expresión de *amh*, éste sería mínimo bajo condiciones de LL y por ende el número de mitosis espermatogoniales, conducente a una maduración final, es menor. En todo caso, se hace necesario más estudios al respecto con el fin de esclarecer su acción específica en el proceso espermatogénico de la lubina.

Por último, si bien con la aplicación de regímenes de luz continua durante el primer año de vida de la lubina se puede disminuir significativamente su maduración precoz, este tipo de tratamiento fotoperiódico no resulta efectivo para evitar la pubertad de los individuos durante su segundo año de vida. Incluso, aún

aplicando dichos regímenes o fotoperiodos de luz continua durante su segundo ciclo vital. No obstante, se demostró que el empleo de fotoperiodos largos puede retrasar la maduración sexual y alterar el crecimiento. Este hecho demuestra que el proceso reproductor en peces, y en particular el de la lubina, está mediado tanto por señales externas como internas del organismo, donde los ritmos endógenos de cada especie tienen un papel fundamental y, en casos de manipulación ambiental prolongada, por ejemplo, de años, ni siquiera se pueden suprimir (Carrillo et al., 2009b). En todo caso, los resultados obtenidos demuestran que mediante la aplicación de fotoperiodos largos aplicados durante el segundo año de vida de la lubina, es posible retrasar la maduración sexual y provocar un incremento del crecimiento, lo que aporta información útil para fines reproductivos y de engorde en empresas acuícolas.

En resumen, la presente tesis aporta nuevas evidencias acerca del efecto que ejerce la luz continua sobre el eje endocrino cerebro-hipófisis-gónada. También, ha permitido la identificación de un periodo corto fotosensible, en el que, aplicando regímenes de luz continua de cierta duración, es posible reducir significativamente la maduración precoz de los machos de lubina, lo cual representa una alternativa más factible y amigable para implementar en los sistemas de cultivo. También abre la posibilidad de focalizar en dicho periodo fotolábil futuros estudios destinados a esclarecer los mecanismos y/o factores que participan en la espermatogénesis y su regulación fotoperiódica, o incluso el desarrollo de nuevas estrategias de tipo fotoperiódicas o de otra índole que permitan en conjunto un mejor manejo en el control de la maduración sexual - precocidad y pubertad- de la lubina.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

Conclusiones

- **Primera.** El análisis de poblaciones monosexo expuestas a luz continua (LL), de corta duración (un mes), entre agosto y noviembre, en el primer año de vida de esta especie ha permitido localizar un periodo fotolábil que coincide con el mes de septiembre. La aplicación de luz continua durante este periodo reduce de manera significativa el porcentaje de machos precoces, que generalmente suele ser elevado en las poblaciones de cultivo experimentales.
- **Segunda.** La luz continua aplicada durante el periodo fotolábil es muy efectiva en la reducción del desarrollo testicular de los machos prepúberes de lubina, asociado con el descenso significativo de las tasas de maduración gonadal (por ejemplo estadios IV y V que denotan presencia de espermatozoides en la gónada), del índice gonadosomático y de los niveles circulantes de 11-ketotestosterona, considerado éste como indicador endocrino relevante del estado de maduración gonadal en los machos.
- **Tercera.** El tratamiento de LL afectó al crecimiento de los animales sometidos a estas condiciones, a pesar de que hay evidencias que muestran resultados contrarios al actual. Esto sugiere que otros factores, no evaluados en este estudio, podrían ser los causantes directos y/o indirectos de esta situación y deberán ser investigados detalladamente en otros programas de estudio. Entre estos factores se incluyen las condiciones de alimentación y cultivo de los animales, el tiempo de eclosión así como el origen genético de cada población.
- **Cuarta.** El tratamiento con LL induce cambios bi-semanales que alteran el ritmo y/o la amplitud de algunos factores reproductivos durante el periodo fotolábil, afectando de forma importante al proceso de maduración de los animales. En efecto, esta alteración rítmica inducida por la luz da como resultado una disminución del contenido de Gnrh1 y Gnrh2 a nivel cerebral, así como una reducción del nivel de expresión de la *fishβ* en la hipófisis y una disminución de los niveles plasmáticos de la hormona estimuladora del folículo, de la 11-ketotestosterona y el estradiol durante las etapas tempranas de la gametogénesis.
- **Quinta.** Se han esclarecido algunos de los mecanismos hormonales que explican el impacto que la LL tiene a nivel testicular, afectando drásticamente

a la maduración de los individuos y, por tanto, reduciendo la aparición de la precocidad en machos prepúberes de lubina mediante las siguientes observaciones: Los niveles bajos de estradiol que muestran los machos sometidos a LL, respecto al grupo control, se asocian a un número reducido de mitosis espermatogoniales a nivel testicular en esta especie. Asimismo, los niveles mantenidos de expresión de la hormona anti-Müllerian, sugieren que este factor de crecimiento podría estar determinando el progreso de la espermatogénesis en esta especie y por tanto actuar como un factor inhibitorio de la meiosis en la lubina.

- **Sexta.** El efecto de la luz continua aplicado en poblaciones monosexo durante su segundo año de vida, a diferencia de los que ocurre durante el primer año, no reduce el número de animales que alcanzan la pubertad, aunque provoca un retraso en su maduración sexual. Esto sugiere que la LL al primer año actúa como un factor inhibitorio del proceso gametogénico y al segundo actúa sólo como un factor dador de ritmo (zeitgeber) que retrasa el ritmo gametogénico.

- **Séptima.** Los resultados obtenidos demuestran que el control de la maduración sexual temprana en machos de lubina puede llevarse a cabo, de manera alternativa, mediante estrategias ambientales de manipulación del fotoperiodo. Concretamente, el uso de regímenes de luz continua, aplicado durante un periodo breve de tiempo y durante el primer año de vida en la lubina, puede ser una medida de aplicación potencial a nivel industrial para paliar la aparición de la precocidad sexual y los efectos negativos que ésta trae consigo para la especie, lo que puede mejorar la rentabilidad del cultivo de la misma.

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFÍA

A continuación se detalla la bibliografía correspondiente a la Introducción, Materiales y Métodos y Discusión general (capítulo 1, 3 y 7, respectivamente).

Abe, H., Oka, Y. 2011. Mechanisms of neuromodulation by a nonhypophysiotropic GnRH system controlling motivation of reproductive behavior in the teleost brain. *Journal of Reproduction and Development*, 57(6), 665-674.

Adams, B. A., Vickers, E. D., Warby, C., Park, M., Fischer, W. H., Grey Craig, A., Rivier, J. E., Sherwood, N. M. 2002. Three forms of gonadotropin-releasing hormone, including a novel form, in a basal salmonid, *Coregonus clupeaformis*. *Biology of Reproduction*, 67(1), 232-239.

Adolfi, M. C., Nakajima, R. T., Nóbrega, R. H., Scharf, M. 2019. Intersex, hermaphroditism, and gonadal plasticity in vertebrates: Evolution of the müllerian duct and Amh/Amhr2 signaling. *Annual Review of Animal Biosciences*, 7, 149-172.

Aizen, J., Meiri, I., Tzchori, I., Levavi-Sivan, B., Rosenfeld, H. 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1-2), 212-221.

Aksnes, A., Gjerde, B., Roald, S. O. 1986. Biological, chemical and organoleptic changes during maturation of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 53(1), 7-20.

Aliaga-Guerrero, M., Paullada-Salmerón, J. A., Piquer, V., Mañanós, E. L., Muñoz-Cueto, J. A. 2018. Gonadotropin-inhibitory hormone in the flatfish, *Solea senegalensis*: Molecular cloning, brain localization and physiological effects. *Journal of Comparative Neurology*, 526(2), 349-370.

Allison, W. T., Hallows, T. E., Johnson, T., Hawryshyn, C. W., Allen, D. M. 2006. Photic history modifies susceptibility to retinal damage in albino trout. *Visual Neuroscience*, 23(1), 25-34.

Almeida, F. F., Taranger, G. L., Norberg, B., Karlsen, Ø., Bogerd, J., Schulz, R. W. 2009. Photoperiod-modulated testis maturation in Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.). *Biology of Reproduction*, 80(4), 631-640.

Almeida, F. L., Lopes, J. S., Crescencio, R., Izel, A. C. U., Chagas, E. C., Boijink, C. 2016. Early puberty of farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*): Possible influence of male sexual maturation on harvest weight. *Aquaculture*, 452, 224-232.

Alvarado, M. V., Carrillo, M., Felip, A. 2013. Expression of kisspeptins and their receptors, *gnrh-1/gnrhr-II-1a* and gonadotropin genes in the brain of adult male and female European sea bass during different gonadal stages. *General and Comparative Endocrinology*, 187, 104-116.

Alvarado, M. V., Carrillo, M., Felip, A. 2015. Melatonin-induced changes in kiss/gnrh gene expression patterns in the brain of male sea bass during spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 185, 69-79.

Alvarado, M. V., Servili, A., Molés, G., Gueguen, M. M., Carrillo, M., Kah, O., Felip, A. 2016. Actions of sex steroids on kisspeptin expression and other reproduction-related genes in the brain of the teleost fish European sea bass. *Journal of Experimental Biology*, 219(21), 3353-3365.

Amer, M. A., Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K. 2001. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biology of Reproduction*, 65(4), 1057-1066.

Ammar, I. B., Teletchea, F., Milla, S., Ndiaye, W. N., Ledoré, Y., Missaoui, H., Fontaine, P. 2015. Continuous lighting inhibits the onset of reproductive cycle in pikeperch males and females. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(2), 345-356.

Ando, N. O., Miura, T. A., Nader, M. A. R., Miura, C. H., Yamauchi, K. O. 2000. A method for estimating the number of mitotic divisions in fish testes. *Fisheries Science*, 66(2), 299-303.

Andreassen, T. K., Skjoedt, K., Anglade, I., Kah, O., Korsgaard, B. 2003. Molecular cloning, characterisation, and tissue distribution of oestrogen receptor alpha in eelpout (*Zoarces viviparus*). *General and Comparative Endocrinology*, 132(3), 356-368.

Antonopoulou, E., Bornestaf, C., Swanson, P., Borg, B. 1999. Feedback control of gonadotropins in Atlantic Salmon, *Salmo salar*, male parr: I. Castration effects in rematuring and nonrematuring fish. *General and Comparative Endocrinology*, 114(1), 132-141.

Aroua S., Le Belle N., Monika S., Sylvie D. 2008. In vitro regulation by activin β and IGF-I of gonadotropin expression in Euroepan eel, *Anguilla anguilla*. 8th I.S.R.P.F. P28: 119.

Aubin-Horth, N., Bourque, J. F., Daigle, G., Hedger, R., Dodson, J. J. 2006. Longitudinal gradients in threshold sizes for alternative male life history tactics in a population of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 63(9), 2067-2075.

Avendaño, M. S., Vazquez, M. J., Tena-Sempere, M. 2017. Disentangling puberty: novel neuroendocrine pathways and mechanisms for the control of mammalian puberty. *Human Reproduction Update*, 23(6), 737-763.

Baekelandt, S., Mandiki, S. N., Schmitz, M., Kestemont, P. 2019. Influence of the light spectrum on the daily rhythms of stress and humoral innate immune markers in pikeperch *Sander lucioperca*. *Aquaculture*, 499, 358-363.

Bairwa, M. K., Saharan, N., Rawat, K. D., Tiwari, V. K., Prasad, K. P. 2017. Effect of light spectra on growth performance and immune response of koi carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). *Fishery Technology*, 54(2), 100-106.

Bayarri, M. J., Falcón, J., Zanuy, S., Carrillo, M. 2010. Continuous light and melatonin: Daily and seasonal variations of brain binding sites and plasma

concentration during the first reproductive cycle of sea bass. *General and Comparative Endocrinology*, 169(1), 58-64.

Baynes, S. M., Scott, A. P. 1985. Seasonal variations in parameters of milt production and in plasma concentration of sex steroids of male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *General and Comparative Endocrinology*, 57(1), 150-160.

Begtashi, I., Rodríguez, L., Moles, G., Zanuy, S., Carrillo, M. 2004. Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). I. Morphological aspects. *Aquaculture*, 241(1-4), 539-559.

Behrens, C., Aurich, J. E., Klug, E., Naumann, H., Hoppen, H. O. 1993. Inhibition of gonadotrophin release in mares during the luteal phase of the oestrous cycle by endogenous opioids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98(2), 509-514.

Behringer, R. R., Cate, R. L., Froelick, G. J., Palmiter, R. D., Brinster, R. L. 1990. Abnormal sexual development in transgenic mice chronically expressing müllerian inhibiting substance. *Nature*, 345(6271), 167.

Berglund, I. 1992. Growth and early sexual maturation in Baltic salmon (*Salmo salar*) parr. *Canadian Journal of Zoology*, 70(2), 205-211.

Berglund, I. 1995. Effects of size and spring growth on sexual maturation in 1+ Atlantic salmon (*Salmo salar*) male parr: interactions with smoltification. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(12), 2682-2694.

Berishvili, G., Baroiller, J. F., Eppler, E., Reinecke, M. 2010. Insulin-like growth factor-3 (IGF-3) in male and female gonads of the tilapia: Development and regulation of gene expression by growth hormone (GH) and 17 α -ethinylestradiol (EE2). *General and Comparative Endocrinology*, 167(1), 128-134.

Besseau, L., Benyassi, A., Møller, M., Coon, S. L., Weller, J. L., Boeuf, G., Klein, D. C., Falcón, J. 2006. Melatonin pathway: breaking the 'high-at-night' rule in trout retina. *Experimental Eye Research*, 82(4), 620-627.

Billard, R., Fostier, A., Weil, C., Breton, B. 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39(1), 65-79.

Billard, R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction Nutrition Développement*, 26(4), 877-920.

Biran, J., Ben-Dor, S., Levavi-Sivan, B. 2008. Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. *Biology of Reproduction*, 79(4), 776-786.

Biran, J., Golan, M., Mizrahi, N., Ogawa, S., Parhar, I. S., Levavi-Sivan, B. 2014. LPXRFa, the piscine ortholog of GnIH, and LPXRF receptor positively regulate gonadotropin secretion in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Endocrinology*, 155(11), 4391-4401.

Blázquez, M., Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., Donaldson, E. M. 1995. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 α -methyltestosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture*, 135(4), 329-342.

Peinado, M. B. Estudio del proceso de diferenciación sexual mediante manipulación hormonal y ambiental de la lubina (*Dicentrarchus labrax*, L) (Doctoral dissertation, Universitat de València).1996.

Blázquez, M., González, A., Papadaki, M., Mylonas, C., Piferrer, F. 2008. Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology*, 158(1), 95-101.

Blázquez, M., Medina, P., Crespo, B., Gómez, A., Zanuy, S. 2017. Identification of conserved genes triggering puberty in European sea bass males (*Dicentrarchus labrax*) by microarray expression profiling. *BMC genomics*, 18(1), 441.

Bogerd, J., Li, K. W., Janssen-Dommerholt, C., Goos, H. 1992. Two gonadotropin-releasing hormones from African catfish (*Clarias gariepinus*). Biochemical and Biophysical Research Communications, 187(1), 127-134.

Bogerd, J., Blomenrohr, M., Andersson, E., Van der Putten, H. H. A. G. M., Tensen, C. P., Vischer, H. F., Granneman, J. C. M., Janssen-Dommerholt, C., Goos, T. J. Th., Schulz, R. W. 2001. Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*). Biology of Reproduction, 64(6), 1633-1643.

Boime, I., Ben-Menahem, D. 1999. U.S. Patent No. 5,958,737. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Bromage, N., Porter, M., Randall, C. 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. En: Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture (pp. 63-98).

Bromley, P. J., Ravier, C., Witthames, P. R. 2000. The influence of feeding regime on sexual maturation, fecundity and atresia in first-time spawning turbot. Journal of Fish Biology, 56(2), 264-278.

Brown, C., Miltiadou, D., Anastasiades, G. 2014. Precocious female maturation in seacage populations of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) in Cyprus. Poster, Aquaculture Europe, San Sebastián, España.

Bryan, M. B., Chung-Davidson, Y. W., Ren, J., Bowman, S., Scott, A. P., Huertas, M., Connolly, M. P., Li, W. 2015. Evidence that progestins play an important role in spermiation and pheromone production in male sea lamprey (*Petromyzon marinus*). General and Comparative Endocrinology, 212, 17-27.

Cabral, H., Costa, M. J. 2001. Abundance, feeding ecology and growth of 0-group sea bass, *Dicentrarchus labrax*, within the nursery areas of the Tagus estuary. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 81(4), 679-682.

Campbell, B., Dickey, J. T., Swanson, P. 2003. Endocrine changes during onset of puberty in male spring Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Biology of Reproduction*, 69(6), 2109-2117.

Carolsfeld, J., Powell, J. F., Park, M., Fischer, W. H., Craig, A. G., Chang, J. P., Rivier, J.E., Sherwood, N. M. 2000. Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, from an ancient teleost, herring. *Endocrinology*, 141(2), 505-512.

Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Cerdá, J., Ramos, J., Mañanós, E., Bromage, N. 1995. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). En: *Broodstock Management and Egg and Larval Quality* (N. Bromage y R.J. Roberts Edit.) pp: 138-168. Blackwell Science Publications. Oxford, Gran Bretaña.

Carrillo, M., Zanuy, S., Bayarri, M.J. 2009a. El control ambiental de la reproducción de los peces con especial referencia al control del ciclo sexual, de la pubertad y de la precocidad. En: *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*. M. Carrillo (coordinador) pp: 173-246. Pub. Cient. Tec. OESA (CSIC/ Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino), Madrid, España (ISBN 978-84-00-08836-1).

Carrillo, M., Zanuy, S., Felip, A., Bayarri, M. J., Molés, G., Gómez, A. 2009b. Hormonal and environmental control of puberty in perciform fish. The case of sea bass. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology: Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163(1), 49-59.

Carrillo, M., Begtashi, I., Rodríguez, L., Marin, M. C., Zanuy, S. 2010. Long photoperiod on sea cages delays timing of first spermiation and enhances growth in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 299(1-4), 157-164.

Carrillo, M., Espigares, F., Felip, A., Escobar, S., Molés, G., Rodríguez, R., Alvarado, M. V., Gómez, A., Zanuy, S. 2015. Updating control of puberty in male European sea bass: A holistic approach. *General and Comparative Endocrinology*, 221, 42-53.

Castellano, J. M., Navarro, V. M., Fernandez-Fernandez, R., Castano, J. P., Malagon, M. M., Aguilar, E., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. 2006. Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 257, 75-83.

Chang, J. P., Van Goor, F., Acharya, S. 1991. Influences of norepinephrine, and adrenergic agonists and antagonists on gonadotropin secretion from dispersed pituitary cells of goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology*, 54(3), 202-210.

Chauvigné, F., Verdura, S., Mazón, M. J., Duncan, N., Zanuy, S., Gómez, A., Cerdà, J. 2012. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone mediate the androgenic pathway in Leydig cells of an evolutionary advanced teleost. *Biology of Reproduction*, 87(2).

Chauvigné, F., Zapater, C., Gasol, J. M., Cerdà, J. 2014. Germ line activation of the luteinizing hormone receptor directly drives spermiogenesis in the flatfish *Solea senegalensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1427-1432.

Chauvigné, F., Parhi, J., Ollé, J., Cerdà, J. 2017. Dual estrogenic regulation of the nuclear progesterin receptor and spermatogonial renewal during gilthead seabream (*Sparus aurata*) spermatogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 206, 36-46.

Chaves-Pozo, E., Liarte, S., Vargas-Chacoff, L., García-López, A., Mulero, V., Meseguer, J., Mancera, J.M., García-Ayala, A. 2007. 17Beta-estradiol triggers postspawning in spermatogenically active gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) males. *Biology of Reproduction*, 76(1), 142-148.

Chen, S. X., Bogerd, J., García-López, Á., de Jonge, H., de Waal, P. P., Hong, W. S., Schulz, R. W. 2010. Molecular cloning and functional characterization of a zebrafish nuclear progesterone receptor. *Biology of Reproduction*, 82(1), 171-181.

Chen, S. X., Bogerd, J., Andersson, E., Almeida, F. L., Taranger, G. L., Schulz, R. W. 2011. Cloning, pharmacological characterization and expression analysis of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) nuclear progesterone receptor. *Reproduction*, 141(4), 491-500.

Chen, S. X., Almeida, F. F., Andersson, E., Taranger, G. L., Schmidt, R., Schulz, R. W., Bogerd, J. 2012. Cloning, pharmacological characterization and expression analysis of Atlantic cod (*Gadus morhua*, L.) nuclear progesterone receptor. *General and Comparative Endocrinology*, 179(1), 71-77.

Chen, S. X., Bogerd, J., Schoonen, N. E., Martijn, J., de Waal, P. P., Schulz, R. W. 2013. A progestin (17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one) stimulates early stages of spermatogenesis in zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 185, 1-9.

Chen, S., Pu, L., Xie, F., Zou, Z., Jiang, Y., Han, K., Wang, Y., Zhang, Z. 2015. Differential expression of three estrogen receptors mRNAs in tissues, growth development, embryogenesis and gametogenesis from large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. *General and Comparative Endocrinology*, 216, 134-151.

Choe, J. R., Shin, Y. S., Choi, J. Y., Kim, T. H., Jung, M. M., Choi, C. Y. 2017. Effect of different wavelengths of light on the antioxidant and immunity status of juvenile rock bream, *Oplegnathus fasciatus*, exposed to thermal stress. *Ocean Science Journal*, 52(4), 501-509.

Choi, C. Y., Habibi, H. R. 2003. Molecular cloning of estrogen receptor α and expression pattern of estrogen receptor subtypes in male and female goldfish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 204(1-2), 169-177.

Clark, B. J., Wells, J., King, S. R., Stocco, D. M. 1994. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *Journal of Biological Chemistry*, 269(45), 28314-28322.

Confente, F., Rendón, M. C., Besseau, L., Falcón, J., Muñoz-Cueto, J. A. 2010. Melatonin receptors in a pleuronectiform species, *Solea senegalensis*: Cloning,

tissue expression, day–night and seasonal variations. *General and Comparative Endocrinology*, 167(2), 202-214.

Conneely, O. M., Mulac-Jericevic, B., Demayo, F., Lydon, J. P., O Malley, B. W. 2002. Reproductive functions of progesterone receptors. *Recent Progress in Hormone Research*, 57, 339-356.

Costa, M. J., Bruxelas, A. 1989. The structure of fish communities in the Tagus Estuary, Portugal, and its role as a nursery for commercial fish species. *Scientia Marina*, 53(2), 561-566.

Cowan, M., Azpeleta, C., López-Olmeda, J. F. 2017. Rhythms in the endocrine system of fish: A review. *Journal of Comparative Physiology B*, 187(8), 1057-1089.

Crespo, B., Gómez, A., Mazón, M. J., Carrillo, M., Zanuy, S. 2013. Isolation and characterization of *Ff1* and *Gsdf* family genes in European sea bass and identification of early gonadal markers of precocious puberty in males. *General and Comparative Endocrinology*, 191, 155-167.

Cuesta, A., Vargas-Chacoff, L., García-López, A., Arjona, F. J., Martínez-Rodríguez, G., Meseguer, J., Mancera, J. M., Esteban, M. A. 2007. Effect of sex-steroid hormones, testosterone and estradiol, on humoral immune parameters of gilthead seabream. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(3), 693-700.

Curtis, H., Barnes, N. S. 2008. *Biología*. 7ta. Edición. Editorial Médica Panamericana, España.

Davie, A., de Quero, C. M., Bromage, N., Treasurer, J., Migaud, H. 2007a.

Inhibition of sexual maturation in tank reared haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) through the use of constant light photoperiods. *Aquaculture*, 270(1-4), 379-389.

Davie, A., Porter, M. J., Bromage, N. R., Migaud, H. 2007b. The role of seasonally altering photoperiod in regulating physiology in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Part

I. Sexual maturation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 64(1), 84-97.

De Benito, F., Maicas, F., Jauralde, I., Martínez, S., Marín, M., Jover, M. 2012. Evaluación de la rentabilidad económica de la producción de dorada (*Sparus auratus*) en jaulas marinas. *Revista AquaTIC*, 37, 123-138.

Degani, G. 2015. 11-ketotestosterone (KT-11), Estradiol estradiol (E2) level and cytochrome P450 (bg-CYP19a) transcription in the testis of male blue gourami (*Trichogaster trichopterus*). *International Journal of Scientific Research*, 4, 641-643.

Dickey, J. T., Swanson, P. 1998. Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of Molecular Endocrinology*, 21(3), 291-306.

Dickey, J. T., Swanson, P. 2000. Effects of salmon gonadotropin-releasing hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology*, 118(3), 436-449.

Dufour, S., Huang, Y. S., Rousseau, K., Sbaihi, M., Le Belle, N., Vidal, B., Marchelidon, J., Querat, B., Burzawa-Gerard, E., Chang, C.F., Schmitz, M. 2000. Puberty in teleosts: new insights into the role of peripheral signals in the stimulation of pituitary gonadotropins. En: Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Anderson E, Stefansson SO (eds) *Reproductive physiology of fish*. University of Bergen/Institute of Marine Research, Bergen, Noruega, pp 455–461.

Dufour, S., Weltzien, F. A., Sebert, M. E., Le Belle, N., Vidal, B., Vernier, P., Pasqualini, C. 2005. Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: Ecophysiological and evolutionary implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040(1), 9-21.

Dufour, S., Sebert, M. E., Weltzien, F. A., Rousseau, K., Pasqualini, C. 2010. Neuroendocrine control by dopamine of teleost reproduction. *Journal of Fish Biology*, 76(1), 129-160.

Emet, M., Ozcan, H., Ozel, L., Yayla, M., Halici, Z., Hacimuftuoglu, A. 2016. A review of melatonin, its receptors and drugs. *The Eurasian Journal of Medicine*, 48(2), 135-141.

Elizur, A. 2009. The KiSS1/GPR54 system in fish. *Peptides*, 30(1), 164-170.

Escobar, S., Servili, A., Felip, A., Espigares, F., Gómez, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Kah, O. 2010. Neuroanatomical characterization of the kisspeptin systems in the brain of european sea bass (*D. labrax*). En: 25th Conference of European Comparative Endocrinologists, Pècs, Hungría, p. 90.

Escobar, S., Felip, A., Gueguen, M. M., Zanuy, S., Carrillo, M., Kah, O., Servili, A. 2013a. Expression of kisspeptins in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Comparative Neurology*, 521(4), 933-948.

Escobar, S., Servili, A., Espigares, F., Gueguen, M. M., Brocal, I., Felip, A., Gomez, A., Carrillo, M. Zanuy, S., Kah, O. 2013b. Expression of kisspeptins and kiss receptors suggests a large range of functions for kisspeptin systems in the brain of the European sea bass. *PLoS One*, 8(7), e70177.

Escobar, S., Felip, A., Salah, M., Zanuy, S., Carrillo, M. 2014. Long-term feeding restriction in prepubertal male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) increases the number of apoptotic cells in the testis and affects the onset of puberty and certain reproductive parameters. *Aquaculture*, 433, 504-512.

Escobar, S., Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M. 2016. Is the kisspeptin system involved in responses to food restriction in order to preserve reproduction in pubertal male sea bass (*Dicentrarchus labrax*)?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 199, 38-46.

Espigares, F., Carrillo, M., Gómez, A., Zanuy, S. 2015a. The forebrain-midbrain acts as functional endocrine signaling pathway of Kiss2/Gnrh1 system controlling

the gonadotroph activity in the teleost fish European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, 92(3), 70.

Espigares, F., Rocha, A., Molés, G., Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S. 2015b. New insights into the factors mediating the onset of puberty in sea bass. *General and Comparative Endocrinology*, 224, 176-185.

Espigares, F., Zanuy, S., Gómez, A. 2015c. Kiss2 as a regulator of Lh and Fsh secretion via paracrine/autocrine signaling in the teleost fish European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, 93(5), 114, 1-12.

Espigares, F., Rocha, A., Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S. 2017. Photoperiod modulates the reproductive axis of European sea bass through regulation of *kiss1* and *gnrh2* neuronal expression. *General and Comparative Endocrinology*, 240, 35-45.

Falcón, J., Besseau, L., Sauzet, S., Boeuf, G. 2007. Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 18(2), 81-88.

Falcon, J., Migaud, H., Muñoz-Cueto, J. A., Carrillo, M. 2010. Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 469-482.

Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M. 2006. Comparative analysis of growth performance and sperm motility between precocious and non-precocious males in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture*, 256(1-4), 570-578.

Felip, A., Zanuy, S., Muriach, B., Cerdá-Reverter, J. M., Carrillo, M. 2008. Reduction of sexual maturation in male *Dicentrarchus labrax* by continuous light both before and during gametogenesis. *Aquaculture*, 275(1-4), 347-355.

Felip, A., Zanuy, S., Pineda, R., Pinilla, L., Carrillo, M., Tena-Sempere, M., Gómez, A. 2009. Evidence for two distinct *KiSS* genes in non-placental vertebrates that

encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 312(1-2), 61-71.

Felip, A., Espigares, F., Zanuy, S., Gómez, A. 2015. Differential activation of kiss receptors by Kiss1 and Kiss2 peptides in the sea bass. *Reproduction*, 150(3), 227-243.

Fernald, R. D., White, R. B. 1999. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 20(3), 224-240.

Filby, A. L., Aerle, R. V., Duitman, J., Tyler, C. R. 2008. The kisspeptin/gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish. *Biology of Reproduction*, 78(2), 278-289.

Fleming, I. A. 1996. Reproductive strategies of Atlantic salmon: ecology and evolution. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 6(4), 379-416.

Fordham, B. S., Trippel, E. A. 1999. Feeding behaviour of cod (*Gadus morhua*) in relation to spawning. *Journal of Applied Ichthyology*, 15(1), 1-9.

França, L. R., Ogawa, T., Avarbock, M. R., Brinster, R. L., Russell, L. D. 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of Reproduction*, 59(6), 1371-1377.

García-López, Á., Fernández-Pasquier, V., Couto, E., Canario, AVM.,

Sarasquete, C., Martínez-Rodríguez, G. 2006. Testicular development and plasma sex steroid levels in cultured male Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup. *General and Comparative Endocrinology*, (147), 343-351.

García-Lopez, A., Bogerd, J., Granneman, J. C., van Dijk, W., Trant, J. M., Taranger, G. L., Schulz, R. W. 2008. Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African catfish. *Endocrinology*, 150(1), 357-365.

García-Lopez, A., de Jonge, H., Nobrega, R. H., de Waal, P. P., van Dijk, W., Hemrika, W., Taranger, G.L., Bogerd, J., Schulz, R. W. 2010. Studies in zebrafish reveal unusual cellular expression patterns of gonadotropin receptor messenger ribonucleic acids in the testis and unexpected functional differentiation of the gonadotropins. *Endocrinology*, 151(5), 2349-2360.

Giannetto, A., Fernandes, J. M., Nagasawa, K., Mauceri, A., Maisano, M., De Domenico, E., Capello, T., Oliva, S., Fasulo, S. 2014. Influence of continuous light treatment on expression of stress biomarkers in Atlantic cod. *Developmental and Comparative Immunology*, 44(1), 30-34.

Ginés, R., Afonso, J. M., Argüello, A., Zamorano, M. J., Lopez, J. L. 2003. Growth in adult gilthead sea bream (*Sparus aurata* L) as a result of interference in sexual maturation by different photoperiod regimes. *Aquaculture Research*, 34(1), 73-83.

Gómez, J. M., Weil, C., Ollitrault, M., Le Bail, P. Y., Breton, B., Le Gac, F. 1999. Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 113(3), 413-428.

González, A., Fernandino, J. I., Somoza, G. M. 2015. Effects of 5 α -dihydrotestosterone on expression of genes related to steroidogenesis and spermatogenesis during the sex determination and differentiation periods of the pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 182, 1-7.

Gothilf, Y., Muñoz-Cueto, J. A., Sagrillo, C. A., Selmanoff, M., Chen, T. T., Kah, O., Elyzur, A., Zohar, Y. 1996. Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. *Biology of Reproduction*, 55(3), 636-645.

Govoroun, M., McMeel, O. M., Mecherouki, H., Smith, T. J., Guiguen, Y. 2001. 17 β -estradiol treatment decreases steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid levels in the rainbow trout testis. *Endocrinology*, 142(5), 1841-1848.

Grier, H. J. 1981. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *American Zoologist*, 21(2), 345-357.

Habibi, H. R., Pati, D. 1993. Extrapituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding sites in goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 11(1-6), 43-49.

Halm, S., Martínez-Rodríguez, G., Rodríguez, L., Prat, F., Mylonas, C. C., Carrillo, M., Zanuy, S. 2004. Cloning, characterisation, and expression of three oestrogen receptors (*ER α* , *ER β 1* and *ER β 2*) in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 223(1-2), 63-75.

Harmon, P. R., Glebe, B. D., Peterson, R. H. 2003. The effect of photoperiod on growth and maturation of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in the Bay of Fundy: Project of the Aquaculture Collaborative Research and Development Program. *Fisheries and Oceans Canada*, 14, 1-4.

Hassin, S., Claire, M., Holland, H., Zohar, Y. 1999. Ontogeny of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression during pubertal development in the female striped bass, *Morone saxatilis* (Teleostei). *Biology of Reproduction*, 61(6), 1608-1615.

Hassin, S., Claire, M., Holland, H., Zohar, Y. 2000. Early maturity in the male striped bass, *Morone saxatilis*: follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone gene expression and their regulation by gonadotropin-releasing hormone analogue and testosterone. *Biology of Reproduction*, 63(6), 1691-1697.

Hawkins, M. B., Thornton, J. W., Crews, D., Skipper, J. K., Dotte, A., Thomas, P. 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(20), 10751-10756.

Healey, M. C., Lake, R., Hinch, S. G. 2003. Energy expenditures during reproduction by sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Behaviour*, 161-182.

Hendry, A. P., Beall, E. 2004. Energy use in spawning Atlantic salmon. *Ecology of Freshwater Fish*, 13(3), 185-196.

Henricks, D. M., Kouba, A. J., Lackey, B. R., Boone, W. R., Gray, S. L. 1998. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: Influence on sperm motility. *Biology of Reproduction*, 59(2), 330-337.

Herland, M. 1960. Étude critique de deux techniques nouvelles afin de mettre en évidence les différentes catégories cellulaires présente dans la glande pituitaire. *Bull Microsc Appl*, 10, 37-44.

Higuchi, K., Gen, K., Izumida, D., Kazeto, Y., Hotta, T., Takashi, T., Aono, H., Soyano, K. 2017. Changes in plasma steroid levels and gene expression of pituitary gonadotropins, testicular steroidogenesis-related proteins and insulin-like growth factors during spermatogenesis of the yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Science*, 83(1), 35-46.

Himick, B. A., Golosinski, A. A., Jonsson, A. C., Peter, R. E. 1993. CCK/gastrin-like immunoreactivity in the goldfish pituitary: regulation of pituitary hormone secretion by CCK-like peptides in vitro. *General and Comparative Endocrinology*, 92(1), 88-103.

Holland, M. C. H., Hassin, S., Zohar, Y. 1998. Effects of long-term testosterone, gonadotropin-releasing hormone agonist, and pimozide treatments on gonadotropin II levels and ovarian development in juvenile female striped bass (*Morone saxatilis*). *Biology of Reproduction*, 59(5), 1153-1162.

Houde, E. D., Zastrow, C. E. 1993. Ecosystem-and taxon-specific dynamic and energetics properties of larval fish assemblages. *Bulletin of Marine Science*, 53(2), 290-335.

Huggard, D., Khakoo, Z., Kassam, G., Mahmoud, S. S., Habibi, H. R. 1996. Effect of testosterone on maturational gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels in the goldfish pituitary. *Biology of Reproduction*, 54(6), 1184-1191.

Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T., Nagahama, Y. 2001. Two subtypes of androgen and progestogen receptors in fish testes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2-3), 449-455.

Imsland, A. K., Folkvord, A., Jónsdóttir, Ó. D., Stefansson, S. O. 1997. Effects of exposure to extended photoperiods during the first winter on long-term growth and age at first maturity in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 159(1-2), 125-141.

Imsland, A. K., Dragsnes, M., Stefansson, S. O. 2003. Exposure to continuous light inhibits maturation in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, 219(1-4), 911-919.

Imsland, A. K., Hanssen, H., Foss, A., Vikingstad, E., Roth, B., Bjørnevik, M., Powell, M., Solberg, C., Norberg, B. 2013. Short-term exposure to continuous light delays sexual maturation and increases growth of Atlantic cod in sea pens. *Aquaculture Research*, 44(11), 1665-1676.

Imsland, A. K., Jonassen, T. M., Hangstad, T. A., Stefansson, S. O., Elvegård, T. A., Lemmens, S. C., Urskog, T. C., Nytrøc, A. V., Reynholds, P. 2018. The effect of continuous light and compressed photoperiods on growth and maturation in lumpfish *Cyclopterus lumpus*. *Aquaculture*, 485, 166-172.

Ito, K., Mochida, K., Fujii, K. 2007. Molecular cloning of two estrogen receptors expressed in the testis of the Japanese common goby, *Acanthogobius flavimanus*. *Zoological Science*, 24(10), 986-997.

Jacobsen, B. M., Horwitz, K. B. 2012. Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 357(1-2), 18-29.

Jakupsstovu, S. H. I., Haug, T. 1988. Spawning of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* in deep waters on the continental slope south west of the Faroe Islands. *Fröðskaparrit*, 34(35), 79-80.

Jamieson, B. G. 1991. Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa: with a survey of lophophorate, echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation. Cambridge University Press, 333 pp.

Jonsson, N., Jonsson, B. 2003. Energy allocation among developmental stages, age groups, and types of Atlantic salmon (*Salmo salar*) spawners. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60(5), 506-516.

Josso, N., di Clemente, N. 2003. Transduction pathway of anti-Müllerian hormone, a sex-specific member of the TGF- β family. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14(2), 91-97.

Kadri, S., Mitchell, D. F., Metcalfe, N. B., Huntingford, F. A., Thorpe, J. E. 1996.

Differential patterns of feeding and resource accumulation in maturing and immature Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 142(3-4), 245-257.

Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Kobayashi, M. 1998. GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream *in vitro*. *General and Comparative Endocrinology*, 112(1), 80-88.

Kah, O., Trudeau, V. L., Sloley, B. D., Chang, J. P., Dubourg, P., Yu, K. L., Peter, R. E. 1992. Influence of GABA on gonadotrophin release in the goldfish. *Neuroendocrinology*, 55(4), 396-404.

Kah, O., Anglade, I., Leprêtre, E., Dubourg, P., de Monbrison, D. 1993. The reproductive brain in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 11(1-6), 85-98.

Kah, O., Zanuy, S., Pradelles, P., Cerdá, J., Carrillo, M. 1994. An enzyme immunoassay for salmon GnRH and its application to the effects of diet on brain

and pituitary GnRH (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology*, 95, 464-474

Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L. G., Vaillant, C., Lareyre, J. J. 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 153(1-3), 346-364.

Kamei, H., Kawazoe, I., Kaneko, T., Aida, K. 2005. Purification of follicle-stimulating hormone from immature Japanese eel, *Anguilla japonica*, and its biochemical properties and steroidogenic activities. *General and Comparative Endocrinology*, 143(3), 257-266.

Karlsen, Ø., Holm, J. C., Kjesbu, O. S. 1995. Effects of periodic starvation on reproductive investment in first-time spawning Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture*, 133(2), 159-170.

Karlsen, Ø., Norberg, B., Kjesbu, O. S., Taranger, G. L. 2006. Effects of photoperiod and exercise on growth, liver size, and age at puberty in farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *ICES Journal of Marine Science*, 63(2), 355-364.

Kazeto, Y., Kohara, M., Miura, T., Miura, C., Yamaguchi, S., Trant, J. M., Adachi, S., Yamauchi, K. 2008. Japanese eel follicle-stimulating hormone (Fsh) and luteinizing hormone (Lh): production of biologically active recombinant Fsh and Lh by *Drosophila* S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. *Biology of Reproduction*, 79(5), 938-946.

Kelley, D. 1986. Bass nurseries on the west coast of the UK. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66(2), 439-464.

Khan, I. A., Thomas, P. 1992. Stimulatory effects of serotonin on maturational gonadotropin release in the Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*. *General and Comparative Endocrinology*, 88(3), 388-396.

Kissil, G. W., Lupatsch, I., Elizur, A., Zohar, Y. 2001. Long photoperiod delayed spawning and increased somatic growth in gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 200(3-4), 363-379.

Kitahashi, T., Ogawa, S., Parhar, I. S. 2009. Cloning and expression of *kiss2* in the zebrafish and medaka. *Endocrinology*, 150(2), 821-831.

Koulish, S., Kramer, C. R., Grier, H. J. 2002. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *Journal of Morphology*, 254(3), 292-311.

Kulczykowska, E., Kalamarz, H., Warne, J. M., Balment, R. J. 2006. Day–night specific binding of 2-[125 I] Iodomelatonin and melatonin content in gill, small intestine and kidney of three fish species. *Journal of Comparative Physiology B*, 176(4), 277.

Kumar, R. S., Ijiri, S., Trant, J. M. 2001. Molecular biology of the channel catfish gonadotropin receptors: 2. Complementary DNA cloning, functional expression, and seasonal gene expression of the follicle-stimulating hormone receptor. *Biology of Reproduction*, 65(3), 710-717.

Kusakabe, M., Nakamura, I., Young, G. 2003. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase complementary deoxyribonucleic acid in rainbow trout: cloning, sites of expression, and seasonal changes in gonads. *Endocrinology*, 144(6), 2534-2545.

Kwok, H. F., So, W. K., Wang, Y., Ge, W. 2005. Zebrafish gonadotropins and their receptors: I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors—Evidence for their distinct functions in follicle development. *Biology of Reproduction*, 72(6), 1370-1381.

Lafont, A. G., Rousseau, K., Tomkiewicz, J., Dufour, S. 2016. Three nuclear and two membrane estrogen receptors in basal teleosts, *Anguilla* sp.: identification, evolutionary history and differential expression regulation. *General and Comparative Endocrinology*, 235, 177-191.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletzl, M., Weismann, T. 2006. Effect of 17 β -estradiol on gamete quality and maturation in two salmonid species. *Aquatic Toxicology*, 79(2), 124-131.

Lee, M. M., Donahoe, P. K. 1993. Mullerian inhibiting substance: A gonadal hormone with multiple functions. *Endocrine Reviews*, 14(2), 152-164.

Lee, Y. R., Tsunekawa, K., Moon, M. J., Um, H. N., Hwang, J. I., Osugi, T., Otaki, N., Sunakawa, Y., Kim, K., Vaudry, H., Kwon, H. B., Seong, J. Y., Tsutsui, K. 2009. Molecular evolution of multiple forms of kisspeptins and GPR54 receptors in vertebrates. *Endocrinology*, 150(6), 2837-2846.

Le Gac, F., Blaise, O., Fostier, A., Le Bail, P. Y., Loir, M., Mourot, B., Weil, C. 1993. Growth hormone (GH) and reproduction: A review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 11(1-6), 219-232.

Le Gac, F., Loir, M., Le Bail, P. Y., Ollitrault, M. 1996. Insulin-like growth factor (IGF-I) mRNA and IGF-I receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and Sertoli cells. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 44(1), 23-35.

Le Gac, F., Lareyre, J. J., Montfort, J., Esquerre, D., Houlgatte, R. 2008. Transcriptional analysis of spermatogenesis regulation by sex steroids in trout. *Cybium*, 32(2), 119-121.

Lejeune, H., Sanchez, P., Saez, J. M. 1998. Enhancement of long-term testosterone secretion and steroidogenic enzyme expression in human Leydig cells by co-culture with human Sertoli cell-enriched preparations. *International Journal of Andrology*, 21(3), 129-140.

Leonardi, M. O., Klempau, A. E. 2003. Artificial photoperiod influence on the immune system of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Hemisphere. *Aquaculture*, 221(1-4), 581-591.

Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mañanós, E. L., Gómez, A., Lareyre, J. J. 2010. Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 412-437.

Li, S., Zhang, Y., Liu, Y., Huang, X., Huang, W., Lu, D., Zhu, P., Shi, Y., Cheng, C. H. K., Liu, X., Lin, H. 2009. Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Endocrinology*, 201(3), 407-418.

Lin, Q., Mei, J., Li, Z., Zhang, X., Zhou, L., Gui, J. F. 2017. Distinct and cooperative roles of amh and dmrt1 in self-renewal and differentiation of male germ cells in zebrafish. *Genetics*, 207(3), 1007-1022.

Liu, G., Luo, F., Song, Q., Wu, L., Qiu, Y., Shi, H., Wang, D., Zhou, L. 2014. Blocking of progestin action disrupts spermatogenesis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Molecular Endocrinology*, 53(1), 57-70.

Liu, Q., Duston, J. 2016. Preventing sexual maturation in Arctic charr by 24 h light overwinter and suppressing somatic growth. *Aquaculture*, 464, 537-544.

Liu, Q., Duston, J. 2018. Efficacy of 24 h light to reduce maturation in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) is dependent on both the start date and duration. *Aquaculture*, 484, 44-50.

Loir, M., Le Gac, F. 1994. Insulin-like growth factor-I and-II binding and action on DNA synthesis in rainbow trout spermatogonia and spermatocytes. *Biology of Reproduction*, 51(6), 1154-1163.

Loir, M. 1999. Spermatogonia of rainbow trout: II. in vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 53(4), 434-442.

Longalong, F. M., Eknath, A. E., Bentsen, H. B. 1999. Response to bi-directional selection for frequency of early maturing females in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 178(1-2), 13-25.

Ma, C. H., Dong, K. W., Yu, K. L. 2000. cDNA cloning and expression of a novel estrogen receptor β -subtype in goldfish (*Carassius auratus*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1490(1-2), 145-152.

Makino, K., Onuma, T. A., Kitahashi, T., Ando, H., Ban, M., Urano, A. 2007. Expression of hormone genes and osmoregulation in homing chum salmon: a minireview. *General and Comparative Endocrinology*, 152(2-3), 304-309.

Maldonado-García, M., Gracia-López, V., Kiewek-Martínez, M., Carrillo, M., Zanuy, S. 2018. Reproductive cycle of leopard grouper *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877) held in captivity: relationship between gonad development and sex steroid concentration. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 46(1), 83-90.

Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R. M. 1995. The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, 83(6), 835.

Mañanós, E. L., Anglade, I., Chyb, J., Saligaut, C., Breton, B., Kah, O. 1999. Involvement of γ -aminobutyric acid in the control of GtH-1 and GtH-2 secretion in male and female rainbow trout. *Neuroendocrinology*, 69(4), 269-280.

Marvel, M., Spicer, O. S., Wong, T. T., Zmora, N., Zohar, Y. 2018. Knockout of the *Gnrh* genes in zebrafish: effects on reproduction and potential compensation by reproductive and feeding-related neuropeptides. *Biology of Reproduction*, 99(3), 565-577.

Massart, S., Milla, S., Kestemont, P. 2014. Expression of gene, protein and immunohistochemical localization of the estrogen receptor isoform ER α 1 in male rainbow trout lymphoid organs; indication of the role of estrogens in the regulation of immune mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 174, 53-61.

Mateos, J., Mañanós, E., Carrillo, M., Zanuy, S. 2002. Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by

gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean sea bass. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 132(1), 75-86.

Mateos, J., Mañanós, E., Swanson, P., Carrillo, M., Zanuy, S. 2006. Purification of luteinizing hormone (LH) in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and development of a specific immunoassay. *Ciencias Marinas* 32(2): 271-283.

Maugars, G., Schmitz, M. 2006. Molecular cloning and characterization of FSH and LH receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 149(1), 108-117.

Maugars, G., Schmitz, M. 2008. Gene expression profiling during spermatogenesis in early maturing male Atlantic salmon parr testes. *General and Comparative Endocrinology*, 159(2-3), 178-187.

Mazón, M. J., Gómez, A., Yilmaz, O., Carrillo, M., Zanuy, S. 2014. Administration of follicle-stimulating hormone in vivo triggers testicular recrudescence of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, 90 (1):6, 1-10.

Mazón, M. J., Molés, G., Rocha, A., Crespo, B., Lan-Chow-Wing, O., Espigares, F., Muñoz, I., Felip, A., Carrillo, M., Zanuy, S., Gómez, A. 2015. Gonadotropins in European sea bass: Endocrine roles and biotechnological applications. *General and Comparative Endocrinology*, 221, 31-41.

McClure, C. A., Hammell, K. L., Moore, M., Dohoo, I. R., Burnley, H. 2007. Risk factors for early sexual maturation in Atlantic salmon in seawater farms in New Brunswick and Nova Scotia, Canada. *Aquaculture*, 272(1-4), 370-379.

McDowell. E. M., Trump. B. F. 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 100(8), 405-414.

McQuillan, H. J., Lokman, P. M., Young, G. 2003. Effects of sex steroids, sex, and sexual maturity on cortisol production: an in vitro comparison of chinook salmon

and rainbow trout interrenals. *General and Comparative Endocrinology*, 133(1), 154-163.

Mechaly, A. S., Viñas, J., Murphy, C., Reith, M., Piferrer, F. 2010. Gene structure of the Kiss1 receptor-2 (*Kiss1r-2*) in the Atlantic halibut: Insights into the evolution and regulation of *Kiss1r* genes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 317(1), 78-89.

Mechaly, A. S., Viñas, J., Piferrer, F. 2012. Sex-specific changes in the expression of kisspeptin, kisspeptin receptor, gonadotropins and gonadotropin receptors in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) during a full reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 162(4), 364-371.

Melamed, P., Sherwood, N. 2005. Hormones and their receptors in fish reproduction. *Molecular Aspects of Fish and Marine Biology*, vol. 4. 308 pp.

Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., Pakdel, F. 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biology of Reproduction*, 66(6), 1881-1892.

Migaud, H., Mandiki, R., Gardeur, J. N., Kestemont, P., Bromage, N., Fontaine, P. 2003. Influence of photoperiod regimes on the Eurasian perch gonadogenesis and spawning. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1-4), 395-397.

Migaud, H., Fontaine, P., Kestemont, P., Wang, N., Brun-Bellut, J. 2004. Influence of photoperiod on the onset of gonadogenesis in Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquaculture*, 241(1-4), 561-574.

Migaud, H., Davie, A., Martinez Chavez, C. C., Al-Khamees, S. 2007. Evidence for differential photic regulation of pineal melatonin synthesis in teleosts. *Journal of Pineal Research*, 43(4), 327-335.

Migaud, H., Davie, A., Taylor, J. F. 2010. Current knowledge on the photoneuroendocrine regulation of reproduction in temperate fish species. *Journal of Fish Biology*, 76(1), 27-68.

Migaud, H., Ismail, R., Cowan, M., Davie, A. 2012. Kisspeptin and seasonal control of reproduction in male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology*, 179(3), 384-399.

Miura, T., Yamauhi, K., Nagahama, Y., Takahashi, H. 1991a. Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. *Zoological Science*, 8(1), 63-73.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y. 1991b. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(13), 5774-5778.

Miura, T., Kasugai, T., Nagahama, Y., Yamauchi, K. 1995. Acquisition of potential for sperm motility in vitro in Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*, 61(3), 533-534.

Miura, C., Miura, T., Yamashita, M., Yamauchi, K., Nagahama, Y. 1996. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in germ-somatic cell coculture from immature Japanese eel testis. *Development, Growth and Differentiation*, 38(3), 257-262.

Miura, T., Miura, C., Ohta, T., Nader, M. R., Todo, T., Yamauchi, K. 1999. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264(1), 230-234.

Miura, T., Miura, C. 2001. Japanese eel: A model for analysis of spermatogenesis. *Zoological Science*, 18(8), 1055-1064.

Miura, T., Miura, C., Konda, Y., Yamauchi, K. 2002. Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Development*, 129(11), 2689-2697.

Miura, T., Miura, C. I. 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1-4), 181-186.

Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K. 2003. Spermatogenesis in the Japanese eel. En: *Eel biology*, pp. 319-329. Springer, Tokio.

Miura, T., Higuchi, M., Ozaki, Y., Ohta, T., Miura, C. 2006. Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(19), 7333-7338.

Miura, C., Ohta, T., Ozaki, Y., Tanaka, H., Miura, T. 2009. Trypsin is a multifunctional factor in spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(49), 20972-20977.

Miura, C., Miura, T. 2011. Analysis of spermatogenesis using an eel model. *Aqua-BioScience Monographs*, 4(4), 105-129.

Miura, C., Shimizu, Y., Uehara, M., Ozaki, Y., Young, G., Miura, T. 2011. Gh is produced by the testis of Japanese eel and stimulates proliferation of spermatogonia. *Reproduction*, 142(6), 869-877.

Miwa, S., Yan, L., Swanson, P. 1994. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by in vitro ligand autoradiography. *Biology of Reproduction*, 50(3), 629-642.

Miyazono, K., Okabe, T., Urabe, A., Takaku, F., Heldin, C. H. 1987. Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 262(9), 4098-4103.

Molés, G., Carrillo, M., Mañanós, E., Mylonas, C. C., Zanuy, S. 2007. Temporal profile of brain and pituitary GnRHs, GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 150(1), 75-86.

Molés, G., Gómez, A., Rocha, A., Carrillo, M., Zanuy, S. 2008. Purification and characterization of follicle-stimulating hormone from pituitary glands of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *General and Comparative Endocrinology*, 158(1), 68-76.

Molés, G. 2011. Caracterización biológica de las gonadotrofinas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) y desarrollo de herramientas biotecnológicas e inmunológicas para su estudio. Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de Valencia, España. 266 pp.

Molés, G., Zanuy, S., Muñoz, I., Crespo, B., Martínez, I., Mañanós, E., Gómez, A. 2011a. Receptor specificity and functional comparison of recombinant sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonadotropins (Fsh and Lh) produced in different host systems. *Biology of Reproduction*, 84(6), 1171-1181.

Molés, G., Gómez, A., Carrillo, M., Rocha, A., Mylonas, C. C., Zanuy, S. 2011b. Determination of Fsh quantity and bioactivity during sex differentiation and oogenesis in European sea bass. *Biology of Reproduction*, 85(4), 848-857.

Molés, G., Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S. 2012. Development of a homologous enzyme-linked immunosorbent assay for European sea bass FSH. Reproductive cycle plasma levels in both sexes and in yearling precocious and non-precocious males. *General and Comparative Endocrinology*, 176(1), 70-78.

Montaner, A. D., Park, M. K., Fischer, W. H., Craig, A. G., Chang, J. P., Somoza, G. M., Rivier, J.E., Sherwood, N. M. 2001. Primary structure of a novel gonadotropin-releasing hormone in the brain of a teleost, pejerrey. *Endocrinology*, 142(4), 1453-1460.

Montserrat, N., González, A., Méndez, E., Piferrer, F., Planas, J. V. 2004. Effects of follicle stimulating hormone on estradiol-17 β production and P-450 aromatase (CYP19) activity and mRNA expression in brown trout vitellogenic ovarian follicles in vitro. *General and Comparative Endocrinology*, 137(2), 123-131.

Moon, J. S., Lee, Y. R., Hwang, J. I., Lee, J. Y., Kim, J. I., Vaudry, H., Kwon, H. B., Seong, J. Y. 2009. Molecular cloning of the bullfrog kisspeptin receptor GPR54 with high sensitivity to *Xenopus* kisspeptin. *Peptides*, 30(1), 171-179.

Morais, R. D. V. S., Nóbrega, R. H., Gómez-González, N. E., Schmidt, R., Bogerd, J., Franca, L. R., Schulz, R. W. 2013. Thyroid hormone stimulates the proliferation of Sertoli cells and single type A spermatogonia in adult zebrafish (*Danio rerio*) testis. *Endocrinology*, 154(11), 4365-4376.

Morais, I. D. S., O'sullivan, F. D. A. 2017. Biologia, habitat e cultivo do tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816). *Scientia Amazonia*, 6(1), 81-93.

Morinaga, C., Saito, D., Nakamura, S., Sasaki, T., Asakawa, S., Shimizu, N., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Tanaka, Minoru., Kondoh, H. 2007. The *hotei* mutation of medaka in the anti-Müllerian hormone receptor causes the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(23), 9691-9696.

Muñoz-Cueto, J. A. 2013. Regulación neuroendocrina de la reproducción en peces teleósteos: aspectos básicos. En "Piscicultura marina en Latinoamérica. Bases científicas y técnicas para su desarrollo". Francesc Castelló i Orvay (coord.). Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona, Barcelona. ISBN: 978-84475-3719-8. pp. 21-34.

Muriach, B., Carrillo, M., Zanuy, S., Cerdá-Reverter, J. M. 2008a. Distribution of estrogen receptor 2 mRNAs (*Esr2a* and *Esr2b*) in the brain and pituitary of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Brain Research*, 1210, 126-141.

Muriach, B., Cerdá-Reverter, J. M., Gómez, A., Zanuy, S., Carrillo, M. 2008b. Molecular characterization and central distribution of the estradiol receptor alpha (ER α) in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 35(1), 33-48.

Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. En: *Fish Physiology*, vol. 9, Part A, pp. 223-275.

Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *The International Journal of Developmental Biology*, 38(2), 217-229.

Navas, J. M., Thrush, M., Ramos, J., Zanuy, S., Carrillo, M., Bromage, N. 1993. Calidad de puesta y niveles plasmáticos de vitelogenina en reproductores de lubina (*Dicentrarchus labrax*) mantenidos con diferentes dietas. En: *Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura*, pp. 19-24.

Nelson, S. N., Van Der Kraak, G. 2010. The role of the insulin-like growth factor (IGF) system in zebrafish (*Danio rerio*) ovarian development. *General and Comparative Endocrinology*, 168(1), 103-110.

Nelson, E. R., Habibi, H. R. 2013. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 192, 15-24.

Nelson, J. S., Grande, T. C., Wilson, M. V. 2016. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, 752 pp.

Ngamvongchon, S., Lovejoy, D. A., Fischer, W. H., Craig, A. G., Nahorniak, C. S., Peter, R. E., Rivier, J. E., Sherwood, N. M. 1992. Primary structures of two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 3(1), 17-22.

Noble, C., Kadri, S., Mitchell, D. F., Huntingford, F. A. 2007. The effect of feed regime on the growth and behaviour of 1+ Atlantic salmon post-smolts (*Salmo salar* L.) in semi-commercial sea cages. *Aquaculture Research*, 38(15), 1686-1691.

Noble, C., Kadri, S., Mitchell, D. F., Huntingford, F. A. 2008. Growth, production and fin damage in cage-held 0+ Atlantic salmon pre-smolts (*Salmo salar* L.) fed either a) on-demand, or b) to a fixed satiation–restriction regime: Data from a commercial farm. *Aquaculture*, 275(1-4), 163-168.

Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., França, L. R. 2009. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 197-206.

Nóbrega, R. H., Morais, R. D. V. S., Crespo, D., De Waal, P. P., De França, L. R., Schulz, R. W., Bogerd, J. 2015. Fsh stimulates spermatogonial proliferation and differentiation in zebrafish via Igf3. *Endocrinology*, 156(10), 3804-3817.

Norberg, B., Weltzien, F. A., Karlsen, Ø., Holm, J. C. 2001. Effects of photoperiod on sexual maturation and somatic growth in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2-3), 357-365.

Oba, Y., Hirai, T., Yoshiura, Y., Yoshikuni, M., Kawauchi, H., Nagahama, Y.

1999. The duality of fish gonadotropin receptors: cloning and functional characterization of a second gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 265(2), 366-371.

Oba, Y., Hirai, T., Yoshiura, Y., Kobayashi, T., Nagahama, Y. 2001. Fish gonadotropin and thyrotropin receptors: the evolution of glycoprotein hormone receptors in vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2-3), 441-448.

Ohga, H., Hirata, D., Matsumori, K., Kitano, H., Nagano, N., Yamaguchi, A., Matsuyama, M. 2017. Possible role of the leptin system in controlling puberty in the male chub mackerel, *Scomber japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 203, 159-166.

Ohga, H., Selvaraj, S., Matsuyama, M. 2018. The roles of kisspeptin system in the reproductive physiology of fish with special reference to chub mackerel studies as main axis. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 147.

Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, H., Aida, K., Miura, T. 2007. Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biology of Reproduction*, 77(6), 970-977.

Okada, T., Kawazoe, I., Kimura, S., Sasamoto, Y., Aida, K., Kawauchi, H. 1994. Purification and characterization of gonadotropin I and II from pituitary glands of tuna (*Thunnus obesus*). *International Journal of Peptide and Protein Research*, 43(1), 69-80.

Okubo, K., Amano, M., Yoshiura, Y., Suetake, H., Aida, K. 2000. A novel form of gonadotropin-releasing hormone in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(1), 298-303.

Okubo, K., Nagahama, Y. 2008. Structural and functional evolution of gonadotropin releasing hormone in vertebrates. *Acta Physiologica*, 193(1), 3-15.

Okuzawa, K. 2002. Puberty in teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1), 31-41.

Ozaki, Y., Higuchi, M., Miura, C., Yamaguchi, S., Tozawa, Y., Miura, T. 2006. Roles of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in fish spermatogenesis. *Endocrinology*, 147(11), 5139-5146.

Papadaki, M., Piferrer, F., Zanuy, S., Maingot, E., Divanach, P., Mylonas, C. C.

2005. Growth, sex differentiation and gonad and plasma levels of sex steroids in male-and female-dominant populations of *Dicentrarchus labrax* obtained through repeated size grading. *Journal of Fish Biology*, 66(4), 938-956.

Parenti, L. R., Grier, H. J. 2004. Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integrative and Comparative Biology*, 44(5), 333-348.

Parhar, I. S., Ogawa, S., Sakuma, Y. 2004. 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*, 145(8), 3613-3618.

Park, Y. J., Park, J. G., Kim, S. J., Lee, Y. D., Saydur Rahman, M., Takemura, A. 2006. Melatonin receptor of a reef fish with lunar-related rhythmicity: cloning and daily variations. *Journal of Pineal Research*, 41(2), 166-174.

Pasquier, J., Lafont, A. G., Leprince, J., Vaudry, H., Rousseau, K., Dufour, S. 2011. First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, *Anguilla anguilla*. *General and Comparative Endocrinology*, 173(1), 216-225.

Passini, G., Carvalho, C. V. A., Sterzelecki, F. C., Baloi, M. F., Cerqueira, V. R. 2019. Spermatogenesis and steroid hormone profile in puberty of laboratory-reared common snook (*Centropomus undecimalis*). *Aquaculture*, 500, 622-630.

Patiño, R., Sullivan, C. V. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1), 57-70.

Paullada-Salmerón, J. A., Cowan, M., Aliaga-Guerrero, M., Morano, F., Zanuy, S., Muñoz-Cueto, J. A. 2016. Gonadotropin inhibitory hormone down-regulates the brain-pituitary reproductive axis of male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, 94(6), 121.

Peng, C., Trudeau, V. L., Peter, R. E. 1993. Seasonal variation of neuropeptide Y actions on growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish: Effects of sex steroids. *Journal of Neuroendocrinology*, 5(3), 273-280.

Peter, R. E., Trudeau, V. L., Sloley, B. D., Peng, C., Nahorniak, C. S. 1991. Actions of catecholamines, peptides and sex steroids in regulation of gonadotropin-II in the goldfish. En: *Reproductive Physiology of Fish* (A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime, M.S. Rolfe, Eds.), Fish Symp. 91, Sheffield, pp. 30-34.

Peyon, P., Zanuy, S., Carrillo, M. 2001. Action of leptin on in vitro luteinizing hormone release in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biology of Reproduction*, 65(5), 1573-1578.

Pfennig, F., Standke, A., Gutzeit, H. O. 2015. The role of Amh signaling in teleost fish—multiple functions not restricted to the gonads. *General and comparative endocrinology*, 223, 87-107.

Pierce, J. G., Parsons, T. F. 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual review of biochemistry*, 50(1), 465-495.

Piferrer, F. 2009. Determinación y diferenciación sexual en los peces. En: *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*, Fundación Observatorio Español de Acuicultura Consejo Superior de Investigaciones Científicas (España) Edits. ISBN: 978-84-8476-630-8. <http://hdl.handle.net/10261/102818>

Pineda, R., Aguilar, E., Pinilla, L., Tena-Sempere, M. 2010. Physiological roles of the kisspeptin/GPR54 system in the neuroendocrine control of reproduction. *Progress in Brain Research*, 181, 55-77.

Ping, Y., Huang, H., Zhang, X. J., Yang, X. L. 2008. Melatonin potentiates rod signals to ON type bipolar cells in fish retina. *The Journal of Physiology*, 586(11), 2683-2694.

Pinilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R. P., Tena-Sempere, M. 2012. Kisspeptins and reproduction: Physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological Reviews*, 92(3), 1235-1316.

Pinto, P. I. S., Teodosio, H. R., Galay-Burgos, M., Power, D. M., Sweeney, G. E., Canario, A. V. 2006. Identification of estrogen-responsive genes in the testis of sea bream (*Sparus auratus*) using suppression subtractive hybridization. *Molecular Reproduction and Development*, 73(3), 318-329.

Planas, J. V., Swanson, P. 1995. Maturation-associated changes in the response of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins (GTH I and GTH II) in vitro. *Biology of Reproduction*, 52(3), 697-704.

Popek, W., Luszczek-Trojnar, E., Drag-Kozak, E., Fortuna-Wronska, D., Epler, P. 2005. Effect of the pineal gland and melatonin on dopamine release from perfused hypothalamus of mature female carp during spawning and winter regression. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 35(2), 65-71.

Powell, J. F., Zohar, Y., Elizur, A., Park, M., Fischer, W. H., Craig, A. G., Rivier, J.E., Lovejoy, D.A., Sherwood, N. M. 1994. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(25), 12081-12085.

Prat, F., Sumpster, J. P., Tyler, C. R. 1996. Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction*, 54(6), 1375-1382.

Prat, F., Zanuy, S., Bromage, N., Carrillo, M. 1999. Effects of constant short and long photoperiod regimes on the spawning performance and sex steroid levels of female and male sea bass. *Journal of Fish Biology*, 54(1), 125-137.

Quérat, B., Hardy, A., Fontaine, Y. A. 1991. Regulation of the type-II gonadotrophin α and β subunit mRNAs by oestradiol and testosterone in the European eel. *Journal of Molecular Endocrinology*, 7(1), 81-86.

Racine, C., Rey, R., Forest, M. G., Louis, F., Ferré, A., Huhtaniemi, I., Josso, N., Di Clemente, N. 1998. Receptors for anti-Müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(2), 594-599.

Rad, F., Bozaoğlu, S., Gözükar, S. E., Karahan, A., Kurt, G. 2006. Effects of different long-day photoperiods on somatic growth and gonadal development in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture*, 255(1-4), 292-300.

Rey, R., Lukas-Croisier, C., Lasala, C., Bedecarrás, P. 2003. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 211(1-2), 21-31.

Roblin, C., Bruslé, J. 1983. Ontogenèse gonadique et différenciation sexuelle du loup *Dicentrarchus labrax*, en conditions d'élevage. *Reproduction Nutrition Développement*, 23(1), 115-127.

Rocha, A., Gómez, A., Zanuy, S., Cerdá-Reverter, J. M., Carrillo, M. 2007. Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 272(1-2), 63-76.

Rocha, A. 2008. Caracterización molecular de los receptores de gonadotrofinas de lubina (*Dicentrarchus labrax*). Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, España, 214 pp.

Rocha, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Gómez, A. 2009. Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass. *General and Comparative Endocrinology*, 162(3), 265-275.

Rocha, A., Zanuy, S., Gómez, A. 2016. Conserved anti-Müllerian hormone: anti-Müllerian hormone type-2 receptor specific interaction and intracellular signaling in teleosts. *Biology of Reproduction*, 94(6), 141, 1-13.

Rodríguez, L., Carrillo, M., Sorbera, L. A., Soubrier, M. A., Mañanós, E., Holland, M. C. H., Zohar, Y., Zanuy, S. 2000. Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. *General and Comparative Endocrinology*, 120(1), 67-74.

Rodríguez, L., Zanuy, S., Carrillo, M. 2001a. Influence of daylength on the age at first maturity and somatic growth in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture*, 196(1-2), 159-175.

Rodríguez, L., Begtashi, I., Zanuy, S., Shaw, M., Carrillo, M. 2001b. Changes in plasma levels of reproductive hormones during first sexual maturation in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under artificial day lengths. *Aquaculture*, 202, 235-248.

Rodríguez, L., Begtashi, I., Zanuy, S., Carrillo, M. 2005. Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.): hormonal aspects. *General and Comparative Endocrinology*, 140(2), 116-125.

Rolland, A. D., Lardenois, A., Goupil, A. S., Lareyre, J. J., Houlgatte, R., Chalmel, F., Le Gac, F. 2013. Profiling of androgen response in rainbow trout pubertal testis: relevance to male gonad development and spermatogenesis. *PLoS One*, 8(1), e53302.

Rowe, D. K., Thorpe, J. E., Shanks, A. M. 1991. Role of fat stores in the maturation of male Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(3), 405-413.

Ruesga, S. M. 2005. *Acuicultura marina mediterránea. Producción, comercialización, competencia internacional del sector español de la lubina y la dorada*. Mundi-Prensa. Madrid. Fundación Alfonso Martín Escudero. 366 pp.

Sakai, N., Ueda, H., Suzuki, N., Nagahama, Y. 1989. Steroid production by amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) testes at different developmental stages. *General and Comparative Endocrinology*, 75(2), 231-240.

Saligaut, C., Linard, B., Mañanos, E. L., Kah, O., Breton, B., Govoroun, M. 1998. Release of pituitary gonadotrophins GtH I and GtH II in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Modulation by estradiol and catecholamines. *General and Comparative Endocrinology*, 109(3), 302-309.

Sambroni, E., Lareyre, J. J., Le Gac, F. 2013. Fsh controls gene expression in fish both independently of and through steroid mediation. *PLoS One*, 8(10), e76684.

Sánchez-Garrido, M. A., Tena-Sempere, M. 2013. Metabolic control of puberty: roles of leptin and kisspeptins. *Hormones and Behavior*, 64(2), 187-194.

Sasayama, Y. Takahashi, H. 1974. Effect of starvation and unilateral castration in male goldfish, *Carassius auratus*, and a design of bioassay for fish gonadotropin using starved goldfish. Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University, 22, 267-279.

Sauzet, S., Besseau, L., Perez, P. H., Covès, D., Chatain, B., Peyric, E., Boeuf, G., Muñoz-Cueto, J. A., Falcón, J. 2008. Cloning and retinal expression of melatonin receptors in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. General and Comparative Endocrinology, 157(2), 186-195.

Sawatari, E., Shikina, S., Takeuchi, T., Yoshizaki, G. 2007. A novel transforming growth factor- β superfamily member expressed in gonadal somatic cells enhances primordial germ cell and spermatogonial proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Developmental Biology, 301(1), 266-275.

Schulz, R. W., Miura, T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. Fish Physiology and Biochemistry, 26(1), 43-56.

Schulz, R. W., Menting, S., Bogerd, J., França, L. R., Vilela, D. A., Godinho, H. P. 2005. Sertoli cell proliferation in the adult testis—Evidence from two fish species belonging to different orders. Biology of Reproduction, 73(5), 891-898.

Schulz, R. W., De França, L. R., Lareyre, J. J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., Miura, T. 2010. Spermatogenesis in fish. General and Comparative Endocrinology, 165(3), 390-411.

Scott, A. P., Sumpter, J. P., Stacey, N. 2010. The role of the maturation-inducing steroid, 17, 20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: A review. Journal of Fish Biology, 76(1), 183-224.

Sébert, M. E., Legros, C., Weltzien, F. A., Malpaux, B., Chemineau, P., Dufour, S. 2008. Melatonin activates brain dopaminergic systems in the eel with an inhibitory impact on reproductive function. Journal of Neuroendocrinology, 20(7), 917-929.

Selvaraj, S., Kitano, H., Fujinaga, Y., Ohga, H., Yoneda, M., Yamaguchi, A., Shimizu, A., Matsuyama, M. 2010. Molecular characterization, tissue distribution, and mRNA expression profiles of two *Kiss* genes in the adult male and female chub mackerel (*Scomber japonicus*) during different gonadal stages. *General and Comparative Endocrinology*, 169(1), 28-38.

Seminara, S. B., Messager, S., Chatzidaki, E. E., Thresher, R. R., Acierno Jr, J. S., Shagoury, J. K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K. M., Kristine, M., Hendrick, A. G., Alan, G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U. B., Slaugenhaupt, S. A., Gusella, J. M., James, F., O'Rahilly, S., Carlton, M. B. L., Crowley, W. F. Jr., Aparicio, S. A. J. R., Colledge, W. H. 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine*, 349(17), 1614-1627.

Senthilkumaran, B., Okuzawa, K., Gen, K., Ookura, T., Kagawa, H. 1999. Distribution and seasonal variations in levels of three native GnRHs in the brain and pituitary of perciform fish. *Journal of Neuroendocrinology*, 11(3), 181-186.

Servili, A., Lethimonier, C., Lareyre, J. J., López-Olmeda, J. F., Sánchez-Vázquez, F. J., Kah, O., Muñoz-Cueto, J. A. 2010. 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*, 151(5), 2265-2275.

Servili, A., Herrera-Pérez, P., del Carmen Rendón, M., Muñoz-Cueto, J. A. 2013. Melatonin inhibits GnRH-1, GnRH-3 and GnRH receptor expression in the brain of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7603-7616.

Shahi, N., Mallik, S. K., Pande, J., Das, P., Singh, A. K. 2015. Spermatogenesis and related plasma androgen and progesterone level in wild male golden mahseer, *Torputitora* (Hamilton, 1822), during the spawning season. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(4), 909-920.

Sherwood, N., Eiden, L., Brownstein, M., Spiess, J., Rivier, J., Vale, W. 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(9), 2794-2798.

Shewmon, L. N., Godwin, J. R., Murashige, R. S., Daniels, H. V., Losordo, T. M. 2007. Environmental manipulation of growth and sexual maturation in yellow perch, *Perca flavescens*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 38(3), 383-394.

Shimizu, A., Yamashita, M. 2002. Purification of mummichog (*Fundulus heteroclitus*) gonadotropins and their subunits, using an immunochemical assay with antisera raised against synthetic peptides. *General and Comparative Endocrinology*, 125(1), 79-91.

Singh, H., Griffith, R. W., Takahashi, A., Kawauchi, H., Thomas, P., Stegeman, J. J. 1988. Regulation of gonadal steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus* by recombinant salmon growth hormone and purified salmon prolactin. *General and Comparative Endocrinology*, 72(1), 144-153.

Siu, A. W., Maldonado, M., Sanchez-Hidalgo, M., Tan, D. X., Reiter, R. J. 2006. Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *Journal of Pineal Research*, 40(2), 101-109.

Skaar, K. S., Nóbrega, R. H., Magaraki, A., Olsen, L. C., Schulz, R. W., Male, R. 2011. Proteolytically activated, recombinant anti-mullerian hormone inhibits androgen secretion, proliferation, and differentiation of spermatogonia in adult zebrafish testis organ cultures. *Endocrinology*, 152(9), 3527-3540

Skarstein, F., Folstad, I., Liljedal, S. 2001. Whether to reproduce or not: immune suppression and costs of parasites during reproduction in the *Arctic charr*. *Canadian Journal of Zoology*, 79(2), 271-278.

Skjæraasen, J. E., Salvanes, A. G. V., Karlsen, Ø., Dahle, R., Nilsen, T., Norberg, B. 2004. The effect of photoperiod on sexual maturation, appetite and growth in wild Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 30(2), 163-174.

Sloley, B.D., Kah, O., Trudeau, V.L., Dulka, J.G., Peter, R.E. 1992. Amino acid neurotransmitters and dopamine in brain and pituitary of the goldfish: Involvement in the regulation of gonadotropin secretion. *Journal of Neurochemistry*, 58(6), 2254-2262.

So, W. K., Kwok, H. F., Ge, W. 2005. Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits—Their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. *Biology of Reproduction*, 72(6), 1382-1396.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1981. *Biometry, the principles and practice of statistics in biological research*. Segunda edición. W.H. Freeman, NY, p 859.

Somoza, G. M., Peter, R. E. 1991. Effects of serotonin on gonadotropin and growth hormone release from in vitro perfused goldfish pituitary fragments. *General and Comparative Endocrinology*, 82(1), 103-110.

Song, M., Gutzeit, H. O. 2003. Effect of 17- α -ethynylestradiol on germ cell proliferation in organ and primary culture of medaka (*Oryzias latipes*) testis. *Development, Growth and Differentiation*, 45(4), 327-337.

Specker, J. L. , Sullivan, C.V. 1994. Vitellogenesis in fishes: Status and perspectives. Davey, K.G., Peter, R.E., Tobe, S.S. (Editores). *Perspectives in Comparative Endocrinology*, 304-315. National Research Council, Ottawa, Canadá.

Stead, S. M., Houlihan, D. F., McLay, H. A., Johnstone, R. 1999. Food consumption and growth in maturing Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(11), 2019-2028.

Stocco, D. M. 2000. The role of the StAR protein in steroidogenesis: Challenges for the future. *The Journal of Endocrinology*, 164(3), 247-253.

Suzuki, K., Kawauchi, H., Nagahama, Y. 1988a. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *General and Comparative Endocrinology*, 71(2), 292-301.

Suzuki, K., Kawauchi, H., Nagahama, Y. 1988b. Isolation and characterization of subunits from two distinct salmon gonadotropins. *General and Comparative Endocrinology*, 71(2), 302-306.

Suzuki, K., Nagahama, Y., Kawauchi, H. 1988c. Steroidogenic activities of two distinct salmon gonadotropins. *General and Comparative Endocrinology*, 71(3), 452-458.

Swanson, P., Bernard, M., Nozaki, M., Suzuki, K., Kawauchi, H., Dickhoff, W. W. 1989. Gonadotropins I and II in juvenile coho salmon. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7(1-6), 169-176.

Swanson, P. 1991. Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. En: *Reproductive Physiology of Fish* pp. 2-7. A.P. Scott, J. Sumpter, D.E. Kime y M.S. Rolfe (Editores). FishSymp. Sheffield.

Swanson, P., Dickey, J. T., Campbell, B. 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1-4), 53-59.

Takeo, J., Yamashita, S. 1999. Two distinct isoforms of cDNA encoding rainbow trout androgen receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 274(9), 5674-5680.

Taranger, G. L., Haux, C., Hansen, T., Stefansson, S. O., Björnsson, B. T., Walther, B. T., Kryvi, H. 1989. Mechanisms underlying photoperiodic effects on age at sexual maturity in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 177(1-4), 47-60.

Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien F-A., Dufour, S., Karlsen, O., Norberg, B., Andersson, E., Hansen, T.

2010. Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 483-515.

Tena-Sempere, M. 2006. GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Human Reproduction Update*, 12(5), 631-639.

Tena-Sempere, M., Felip, A., Gómez, A., Zanuy, S., Carrillo, M. 2012. Comparative insights of the kisspeptin/kisspeptin receptor system: lessons from non-mammalian vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 175(2), 234-243.

Teves, A. C., Granneman, J. C., Van Dijk, W., Bogerd, J. 2003. Cloning and expression of a functional estrogen receptor-alpha from African catfish (*Clarias gariepinus*) pituitary. *Journal of Molecular Endocrinology*, 30(2), 173-185.

Thomas, P., Dressing, G., Pang, Y., Berg, H., Tubbs, C., Benninghoff, A., Doughty, K. 2006. Progesterin, estrogen and androgen G-protein coupled receptors in fish gonads. *Steroids*, 71(4), 310-316.

Thomas, P. 2008. Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPR α) and progesterone membrane receptor component 1 (PGMRC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29(2), 292-312.

Thomas, P. 2012. Rapid steroid hormone actions initiated at the cell surface and the receptors that mediate them with an emphasis on recent progress in fish models. *General and Comparative Endocrinology*, 175(3), 367-383.

Thomson, A. L. 1950. Factors determining the breeding seasons of birds: An introductory review. *Ibis*, 92(2), 173-184.

Todo, T., Ikeuchi, T., Kobayashi, T., Nagahama, Y. 1999. Fish androgen receptor: cDNA cloning, steroid activation of transcription in transfected mammalian cells, and tissue mRNA levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254(2), 378-383.

Todo, T., Ikeuchi, T., Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Suzuki, K., Yoshikuni, M., Yamauchi, K., Nagahama, Y. 2000. Characterization of a testicular 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (a spermiation-inducing steroid in fish) receptor from a teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*). FEBS Letters, 465(1), 12-17.

Tovo-Neto, A., da Silva Rodrigues, M., Habibi, H. R., Nóbrega, R. H. 2018. Thyroid hormone actions on male reproductive system of teleost fish. General and Comparative Endocrinology 265, 230-236.

Trinh, K. Y., Wang, N. C., Hew, C. L., Crim, L. W. 1986. Molecular cloning and sequencing of salmon gonadotropin β subunit. European Journal of Biochemistry, 159(3), 619-624

Trombley, S., Schmitz, M. 2013. Leptin in fish: possible role in sexual maturation in male Atlantic salmon. Fish Physiology and Biochemistry, 39(1), 103-106.

Trombley, S., Mustafa, A., Schmitz, M. 2014. Regulation of the seasonal leptin and leptin receptor expression profile during early sexual maturation and feed restriction in male Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. General and Comparative Endocrinology, 204, 60-70.

Trudeau, V. L. 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. Reviews of Reproduction, 2(1), 55-68.

Tubbs, C., Thomas, P. 2008. Progestin signaling through an olfactory G protein and membrane progestin receptor- α in Atlantic croaker sperm: potential role in induction of sperm hypermotility. Endocrinology, 150(1), 473-484.

Tveiten, H., Johnsen, H. K., Jobling, M. 1996. Influence of maturity status on the annual cycles of feeding and growth in Arctic charr reared at constant temperature. Journal of Fish Biology, 48(5), 910-924.

Tyler, C.R. Beresford, N., Van Der Woning, M., Sumpter, J.P., Thorpe, K. 2000. Metabolism and environmental degradation of pyrethroid insecticides produce

compounds with endocrine activities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 (4), 801-809.

Umino, O., Dowling, J. E. 1991. Dopamine release from interplexiform cells in the retina: effects of GnRH, FMRFamide, bicuculline, and enkephalin on horizontal cell activity. *Journal of Neuroscience*, 11(10), 3034-3046.

Unwin, M. J., Rowe, D. K., Poortenaar, C. W., Boustead, N. C. 2005. Suppression of maturation in 2-year-old Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) reared under continuous photoperiod. *Aquaculture*, 246(1-4), 239-250.

Van Aerle, R., Kille, P., Lange, A., Tyler, C. R. 2008. Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides*, 29(1), 57-64.

Vandeputte, M., Dupont-Nivet, M., Chavanne, H., Chatain, B. 2007. A polygenic hypothesis for sex determination in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Genetics*, 176(2), 1049-1057.

Van Der Kraak, G., Suzuki, K., Peter, R. E., Itoh, H., Kawauchi, H. 1992. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *General and Comparative Endocrinology*, 85(2), 217-229.

Vera, L. M., Migaud, H. 2009. Continuous high light intensity can induce retinal degeneration in Atlantic salmon, Atlantic cod and European sea bass. *Aquaculture*, 296(1-2), 150-158.

Vihtelic, T. S., Hyde, D. R. 2000. Light-induced rod and cone cell death and regeneration in the adult albino zebrafish (*Danio rerio*) retina. *Developmental Neurobiology*, 44(3), 289-307.

Viñas, J., Piferrer, F. 2008. Stage-specific gene expression during fish spermatogenesis as determined by laser-capture microdissection and quantitative-

PCR in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonads. *Biology of Reproduction*, 79(4), 738-747.

Vischer, H. F., Bogerd, J. 2003. Cloning and functional characterization of a gonadal luteinizing hormone receptor complementary DNA from the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biology of Reproduction*, 68(1), 262-271.

Volkoff, H., Peter, R. E. 1999. Actions of two forms of gonadotropin releasing hormone and a GnRH antagonist on spawning behavior of the goldfish *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, 116(3), 347-355.

Wade, LG Jr. 2004. *Química Orgánica*. 5ta. Edición. Pearson Educación S.A, Madrid.

Weltzien, F. A., Norberg, B., Swanson, P. 2003. Isolation and characterization of FSH and LH from pituitary glands of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 131(2), 97-105.

White, S. A., Kasten, T. L., Bond, C. T., Adelman, J. P., Fernald, R. D. 1995. Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(18), 8363-8367.

White, S. A., Nguyen, T., Fernald, R. D. 2002. Social regulation of gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Experimental Biology*, 205(17), 2567-2581.

Wu, C., Patiño, R., Davis, K. B., Chang, X. 2001. Localization of estrogen receptor α and β RNA in germinal and nongerminal epithelia of the channel catfish testis. *General and Comparative Endocrinology*, 124(1), 12-20.

Wylie, M. J., Setiawan, A. N., Irvine, G. W., Symonds, J. E., Elizur, A., Lokman, P. M. 2018. Effects of neuropeptides and sex steroids on the pituitary-gonadal axis of pre-pubertal F1 wreckfish (hāpuku) *Polyprion oxygeneios* in vivo: Evidence of

inhibitory effects of androgens. *General and Comparative Endocrinology*, 257, 113-121.

Xie, Y., Chu, L., Liu, Y., Sham, K. W., Li, J., Cheng, C. H. 2017. The highly overlapping actions of Lh signaling and Fsh signaling on zebrafish spermatogenesis. *Journal of Endocrinology*, 234(3), 233-246.

Yada, T., Nakanishi, T. 2002. Interaction between endocrine and immune systems in fish. *International Review of Cytology*, 220, 35-92.

Yadav, H., Lal, B. 2016. Intra-gonadal factors in fish gonad. *Journal of Scientific Research*, 60, 37-41.

Yang, B., Jiang, Q., Chan, T., Ko, W. K., Wong, A. O. 2010. Goldfish kisspeptin: molecular cloning, tissue distribution of transcript expression, and stimulatory effects on prolactin, growth hormone and luteinizing hormone secretion and gene expression via direct actions at the pituitary level. *General and Comparative Endocrinology*, 165(1), 60-71.

Yaron, Z. V. I., Gur, G. A. L., Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., Levavi-Sivan, B. 2003. Regulation of fish gonadotropins. *International Review of Cytology*, 225, 131-185.

Yaron Z, Sivan B. 2006. Reproduction. En: *The physiology of fishes*. D.H. Evans y J.B Claibourne (Editores). Tercera edición, CRC Press, Taylor y Francis, Boca Raton, pp. 333-386.

Yilmaz O. 2006. Efecto de la luz continua y de los andrógenos sobre el desarrollo testicular de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). Tesina del IV Máster Universitario Internacional en Acuicultura, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España.

Yu, K. L., Peter, R. E. 1992. Adrenergic and dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone release from goldfish preoptic-anterior hypothalamus and pituitary in vitro. *General and Comparative Endocrinology*, 85(1), 138-146.

Yu, K. L., He, M. L., Chik, C. C., Lin, X. W., Chang, J. P., Peter, R. E. 1998. mRNA expression of gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) and GnRH receptor in goldfish. *General and Comparative Endocrinology*, 112(3), 303-311.

Yueh, W. S., Chang, C. F. 1997. 17α , 20β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one and 17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one stimulated spermiation in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 17(1-6), 187-193.

Zanuy, S., Carrillo, M., Ruiz, F. 1986. Delayed gametogenesis and spawning of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) kept under different photoperiod and temperature regimes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2(1-4), 53-63.

Zanuy, S., Prat, F., Carrillo, M., Bromage, N. R. 1995. Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17β -oestradiol levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources*, 8(2), 147-152.

Zanuy, S., Carrillo, M., Mateos, J., Trudeau, V., Kah, O. 1999. Effects of sustained administration of testosterone in pre-pubertal sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 177(1-4), 21-35.

Zhu, Y., Rice, C. D., Pang, Y., Pace, M., Thomas, P. 2003. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2231-2236.

Zohar, Y., Elizur, A., Sherwood, N. M., Powell, J. F. F., Rivier, J. E., Zmora, N. 1995. Gonadotropin-releasing activities of the three native forms of gonadotropin-

CAPÍTULO 9 BIBLIOGRAFÍA

releasing hormone present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *General and Comparative Endocrinology*, 97(3), 289-299.

Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J. A., Elizur, A., Kah, O. 2010. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 438-455.