



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Trabajo Final de Master interuniversitario en acuicultura 2018/19

Efecto del estradiol en testículos de lubina (*Dicentrarchus labrax*) en pregametogénesis

Amanda Paz Escorza Sius

Tutores: Ana Gómez Peris (CSIC), Juan F. Asturiano (UPV)

Grado: Máster en Acuicultura



Ana Gómez Peris
Tel.: 964 319500 ext. 239
a.gomez@csic.es

La Dra. Ana Gómez Peris, Científico Titular del CSIC , Instituto de Acuicultura Torre de la Sal, Departamento de Fisiología de Peces y Biotecnología, hace constar que:

Amanda Paz Escorza Sius, estudiante del Master interuniversitario de Acuicultura edición 2018/19, ha realizado bajo mi dirección, en el Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (CSIC), el trabajo de investigación titulado: “Efecto del estradiol en testículos de lubina (*Dicentrarchus labrax*) en pregametogénesis”, cuya memoria, que se presenta como Trabajo Fin de Master, he revisado para su aprobación.

En Torre de la Sal, a 15 de Septiembre de 2019



Fdo.
Dra. Ana Gómez Peris

Listado de abreviaturas

11-KT	11-cetotestosterona
Amh	Hormona anti-mülleriana
AR/Ar	Receptor de andrógenos
AT	Actividad total
Bo	Ligado máximo
BSA	Albumina de suero bovino
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CHG	Cerebro-hipófisis-gónada
Ct	Ciclo umbral
DAB	Diaminobencidina
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
DHP	Dihidroxiprogesterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
E2	17 β -Estradiol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EIA	Enzimoimmunoensayo
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
ER/Er	Receptor de estradiol
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
FSH/Fsh	Hormona folículo estimulante
FSHR/Fshr	Receptor de la hormona folículo estimulante
GABA	Ácido γ aminobutírico
GnRH/Gnrh	Factor liberador de las gonadotropinas
GnRHa	Análogo de la GnRH
GSI	Índice gonadosomático
GTHs	Gonadotropinas
hCG	Hormona gonadotrofina coriónica humana
IATS	Instituto de Acuicultura de Torre la Sal
IE	Interensayo
IHC	Inmunohistoquímica
LH/Lh	Hormona luteinizante
LHR/Lhr	Receptor de la hormona luteinizante
MIF	Factor inhibidor Mülleriano
MIH	Hormona inductora de la maduración

mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
N	Blanco
NGS	Suero de cabra (<i>normal goat serum</i>)
NPY	Neuropéptido Y
NSB	Ligado no específico
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polimerase chain reaction</i>)
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
rmp	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcripción inversa
SEM	Media
StgA und	Espermatogonia A indiferenciada
StgA diff	Espermatogonia A diferenciada
StgB	Espermatogonia B
StAR	Proteína reguladora aguda esteroideogénica
TAE	Tris base – ácido acético – EDTA
T	Testosterona
TMB	Peroxidasa de rábano (<i>peroxidase substrate solution</i>)

Resumen

El estudio de aspectos básicos en Acuicultura como la reproducción de especies altamente producidas, es de gran interés socioeconómico. La lubina es un pez perciforme del Mediterráneo altamente apreciado en el mercado europeo y de gran importancia en la Acuicultura mediterránea. Además, es un modelo ideal para ensayos de fisiología reproductiva ya que dispone de muchas herramientas para su estudio. Por lo tanto, conocer las condiciones óptimas para su reproducción facilitarían el desarrollo de este comercio. Con el objetivo de indagar en la reproducción, el presente estudio pretende demostrar el efecto del estradiol sobre el desarrollo gonadal mediante la evaluación de expresión génica, síntesis y secreción de gonadotrofinas en hipófisis y concentración plasmática de esteroides sexuales. Para ello se utilizaron implantes con estradiol, se determinó el índice gonadosomático, se midieron las concentraciones de gonadotrofinas en plasma e hipófisis, y la de esteroides sexuales solo a nivel plasmático, mediante inmunoensayos, mientras que la evaluación de la expresión génica se realizó por medio de PCR cuantitativa. La hipótesis de este experimento fue encontrar un aumento en la proliferación celular de espermatogonias durante la pregametogénesis en lubina europea.

Los resultados muestran que la exposición a estradiol no afecta a la proliferación de espermatogonias A, genera un descenso en la expresión del gen *fsh β* , mientras que el gen *lh β* se ve promovido bajo la presencia de estradiol. Las concentraciones de Fsh en hipófisis disminuyen al estar inhibida la expresión del gen, efecto que se puede observar también en plasma. Por otra parte, Lh no presenta cambios en las concentraciones hipofisarias, sin embargo, las concentraciones en plasma muestran una reducción de la hormona. En cuanto a los andrógenos se observó una disminución de las concentraciones plasmáticas.

Palabras clave: acuicultura, lubina, gonadotrofinas, esteroides sexuales, espermatogénesis.

Abstract

The study of the Aquaculture's basic aspects, such as the reproduction of highly produced species, generates great socioeconomic interest. The Sea bass is a Mediterranean perciform fish, greatly appreciated in the European market and a very important specie for the Mediterranean Aquaculture. In addition, it is an ideal model for reproductive physiology assays because it has many tools available. Therefore, knowing the optimal conditions of its reproduction would facilitate the development of this trade. In order to investigate its reproduction, the present study aims to demonstrate the effect of estradiol on gonadal development by evaluating gene expression, synthesis and secretion of gonadotrophins in the pituitary gland and plasma concentration of sex steroids. To achieve this objective, implants with estradiol were used, the gonadosomatic index was determined, the concentrations of gonadotrophins in plasma and pituitary gland, and sex steroids were measured only at the plasma level, by immunoassays, while the evaluation of gene expression was carried out by means of quantitative PCR. The hypothesis of this experiment was to find an increase in proliferation of spermatogonia cell during pregametogenesis in European sea bass.

The results show that exposure to estradiol does not affect the proliferation of spermatogonia A, it produces a decrease in the *fsh β* gene expression, while the *lh β* gene is promoted under the presence of estradiol. Fsh pituitary concentrations decrease when gene expression is inhibited, an effect that can also be observed in plasma. Moreover, Lh does not show changes in pituitary concentrations, however, plasma concentrations demonstrated a reduction of the hormone. Regarding androgens, a decrease in plasma concentrations was observed.

Keywords: aquaculture, sea bass, gonadotropins, sexual steroids, spermatogenesis.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Lubina europea	1
1.2. Estructura del testículo y espermatogénesis.....	1
1.2.1. Estructura del testículo de teleósteos.....	1
1.2.2. Espermatogénesis	2
1.3. Control hormonal de la espermatogénesis en peces teleósteos	4
1.3.1. Cerebro – Neuropeptidos.....	5
1.3.2. Hipófisis – Gonadotrofinas.....	5
1.3.3. Gónada – Esteroides sexuales	6
2. Objetivos	9
2.1. Objetivo general	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. Materiales y métodos	10
3.1. Diseño experimental y animales.....	10
3.2. Análisis hormonales.....	11
3.2.1. Inmunoensayo para la detección de esteroides sexuales	11
3.2.2. Inmunoensayo para la detección de gonadotrofinas en plasma e hipófisis	12
3.3. Aislamiento de RNA, obtención del cDNA y cuantificación de expresión génica... 13	
3.3.1. Obtención y evaluación del RNA de hipófisis.	13
3.3.2. Obtención de cDNA por transcripción reversa	14
3.3.3. PCR cuantitativo	15
3.4. Estudio del desarrollo gonadal: GSI, histología e inmunohistoquímica.	16
3.4.1. Cálculo del GSI.....	16
3.4.2. Histología e inmunohistoquímica.....	16
3.5. Análisis estadístico	18
4. Resultados	19
4.1. Efecto de implantes con E2 en los niveles plasmáticos de esta hormona en lubinas durante pregametogénesis	19
4.2. Efecto del E2 en el desarrollo morfológico del testículo: biometría, observaciones histológicas e inmunohistoquímica	19
4.3. Efecto del E2 en la expresión, producción y secreción de gonadotrofinas Fsh y Lh en machos de lubina durante pregametogénesis	23

4.4. Cambios en los niveles plasmáticos de hormonas esteroideas T y 11-KT bajo el efecto del estradiol	25
5. Discusión	26
5.1. Eficiencia de los implantes de E2	26
5.2. Determinación del desarrollo gonadal: GSI, observaciones histológicas e inmunohistoquímica	26
5.3. Efecto del E2 sobre la expresión, producción y secreción de gonadotropinas Fsh y Lh en machos de lubina durante pregametogénesis	27
5.4. Cambios en los niveles plasmáticos de hormonas esteroideas T y 11-KT bajo el efecto del estradiol	29
6. Conclusión	30
7. Bibliografía	31

1. Introducción

1.1. Lubina europea

La lubina, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) (Fig. 1) es una especie marina de la familia de los Moronidae más producidas en Europa, con énfasis en países mediterráneos como España, Turquía, Italia, Grecia, Croacia y Egipto (APROMAR, 2018). De manera natural, la lubina es capaz de habitar en diferentes condiciones por su capacidad euri térmica (8-24 °C) (Moreira et al., 1992) y eurihalina (3‰ hasta agua de mar) (Barnabé, 1991). Se alimenta de pequeños peces y moluscos que puede triturar con sus dientes vomerianos (Fischer et al., 1987).



Figura 1. Lubina europea (*Dicentrarchus labrax*). Recopilado de Mazón, (2014).

En el mediterráneo, los machos adultos producen nuevas células germinales durante el verano (julio - agosto), luego en septiembre se inicia la espermatogénesis, proceso realizado durante todo el otoño e invierno, solapándose con la espermiogénesis y la puesta, que se lleva a cabo cerca de estuarios durante los meses de invierno y primavera (diciembre - marzo). Tras la puesta, comienza un periodo de reabsorción celular (abril - julio) que coincide con la producción de nuevas células germinales (Barnabé, 1991).

La lubina es una especie gonocórica, es decir, no ocurren cambios de sexo a lo largo del ciclo vital. Las hembras tienen un desarrollo ovárico de tipo sincrónico por grupo y alcanzan la madurez sexual entre los 3 a 4 años, siendo más grandes (en torno a 31 – 40 cm) que los machos (23 – 30 cm), quienes alcanzan la madurez alrededor de los 2 a 3 años (Barnabé, 1991). Esta característica permite diferenciar entre machos y hembras, ya que no presentan dimorfismo ni caracteres sexuales secundarios en ningún momento del ciclo de vida (Mazón, 2014).

1.2. Estructura del testículo y espermatogénesis

1.2.1 Estructura del testículo de teleósteos

En peces y mamíferos, las gónadas se componen de dos testículos u ovarios dispuestos de manera bilateral en posición dorso lateral de la cavidad peritoneal. Los testículos incluyen dos compartimientos, uno intertubular o intersticial y otro tubular o germinal. El compartimiento intertubular contiene a las células de Leydig, vasos linfáticos, macrófagos, mastocitos, células neuronales y tejido conectivo en contacto directo con la pared del testículo, mientras que el compartimiento tubular o germinal, se encuentra delimitado por la membrana basal, y está compuesto de células germinales y células somáticas o de Sertoli (Schulz et al., 2010). En los teleósteos se ha descrito dos tipos de estructura testicular, la tubular y la lobular (Molés, 2011b). El testículo de tipo tubular se distingue por presentar las espermatogonias totalmente restringidas a la parte distal del túbulo. Este tipo testicular es

más frecuente en peces menos evolucionados como los Anterininiformes. El testículo tipo lobular es más frecuente en teleósteos y se caracteriza por poseer una serie de lóbulos separados por tejido fibroso (Espinoza & Labarte, 1987), en cada lóbulo se encuentran cistes compuestos de células de Sertoli que rodean 1 o varias células germinales que se desarrollan en conjunto (Billard et al., 1982).

1.2.2. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso que comprende la producción de espermatozoides haploides altamente diferenciados a partir de un número reducido de células madre diploides, las espermatogonias. Este proceso se lleva a cabo dentro de cistes espermáticas compuestas por células de Sertoli que envuelven a las células germinales. Estas últimas sufrirán divisiones seriadas generando clones. A su vez, las células de Sertoli se encuentran rodeadas de un tejido que se encuentra en contacto con las células de Leydig, encargadas de la secreción de esteroides sexuales que promueven la espermatogénesis (Fig. 2).

La espermatogénesis contempla tres etapas principales: 1) fase proliferativa, cuando ocurre la proliferación mitótica de espermatogonias, 2) fase meiótica, cuando ocurre la primera meiosis y se generan los espermatocitos y espermátidas, y 3) fase espermiogénica, cuando ocurre la transformación de las espermátidas en espermatozoides funcionales, pero no activos (Schulz et al., 2010).

1) Fase proliferativa: en esta fase las células madre o espermatogonias A indiferenciadas (StgA und) sufren divisiones mitóticas que originan dos tipos celulares: nuevas células madre para la auto renovación (más células madre) y espermatogonias A diferenciadas (StgA diff), encaminadas a la proliferación por mitosis. Cada especie tiene un número de divisiones mitóticas, que está determinado genéticamente y que definirá la cantidad de espermatozoides final. En anguila japonesa (*Anguilla japonica*) y pez dorado (*Carassius auratus*) se ha observado que estas divisiones están reguladas por la hormona 11-cetotestosterona (11-KT), producida por las células de Leydig (Schulz et al., 2010).

Las StgA und se distinguen morfológicamente al ser las más grandes a lo largo del proceso espermatogénico, se encuentran aisladas y poseen un gran núcleo (Schulz et al., 2010; Lacerda et al. 2014). Por otra parte, las StgA diff (espermatogonias A diferenciadas), se distinguen por poseer un único núcleo de forma redonda con uno o más nucléolos y envoltura regular, menor cantidad de heterocromatina y un gran volumen citoplasmático (Schulz et al., 2010; Lacerda et al., 2014).

Posteriormente las StgA diff se dividen por mitosis y se diferencian en espermatogonias tipo B (2n) (StgB). Las StgB generadas a partir de una misma StgA se mantienen dentro de un mismo ciste. Se caracterizan por tener una gran cantidad de heterocromatina, núcleo con 2 o más nucléolos, el tamaño celular y volumen nuclear decrecen, y poseen un pequeño volumen citoplasmático en relación con el estadio anterior. Antes de la última división mitótica se originan las StgB tardías, que son la última generación de espermatogonias antes de la formación de espermatocitos primarios. Las StgB tardías se distinguen por un núcleo usualmente redondo y más pequeño, la heterocromatina alcanza la densidad máxima y el volumen citoplasmático se reduce aún más (Schulz et al., 2010; Lacerda et al., 2014).

2) Fase meiótica: en la última división mitótica se originan los espermatocitos tipo I, los cuales sufren la primera división por meiosis. Aún son células diploides y se pueden

distinguir por poseer un gran tamaño que refleja la larga duración de la profase durante la primera división meiótica (Schulz et al., 2010). El final de la primera meiosis da lugar a la aparición de los espermatocitos tipo II, que tienen una vida corta y sufren la segunda meiosis originando las espermátidas, que son las primeras células haploides (Lacerda et al., 2014).

3) Fase espermiogénica: la transformación de espermátidas a espermatozoides genera una pérdida del 80 al 90% del volumen celular, dentro del núcleo la cromatina se condensa al máximo y se expulsa el material celular al lumen del ciste (Fig. 2). El espermatozoide tiene todo lo necesario para realizar su actividad. La energía para el movimiento del flagelo está albergada en el cuello del espermatozoide, el cual tiene un alto contenido en mitocondrias, carbohidratos, lípidos y aminoácidos. Se ha observado que el tamaño de esta estructura se encuentra relacionado con la duración de la motilidad, sin embargo, el movimiento no se activará hasta que ocurra un aumento de pH en el plasma seminal que genera la maduración o capacitación del espermatozoide (Miura & Miura 2003).

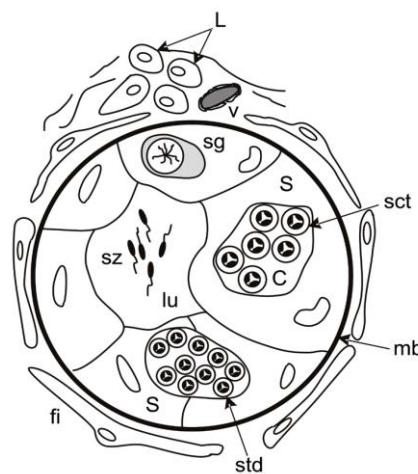


Figura 2. Esquema de la organización del lóbulo testicular durante el proceso de espermatogénesis que muestra los distintos estados de las células germinales en las células de Sertoli. S: células de Sertoli; L: células de Leydig; V: vasos sanguíneos; sg: espermatogonias; sct: espermatocitos; std: espermátidas; lu: lumen lobular; mb: membrana basal; fi: fibroblastos. Adaptado de Billard et al. (1982).

Las células de Sertoli son capaces de sostener la supervivencia, desarrollo y funcionamiento de las células germinales a lo largo de su división y desarrollo, además de tener la cualidad de fagocitar las células apoptóticas, cuerpos residuales de espermátidas y esperma residual. Las células germinales solo pueden sobrevivir en contacto continuo con las células de Sertoli, es por esto, que el número de las últimas determina la capacidad espermatogénica en los testículos (Schulz et al., 2009). El número de células de Sertoli por ciste incrementa durante el periodo que las espermatogonias se encuentran en mitosis. Esta proliferación de células germinales conlleva a un aumento en el volumen del ciste (Nagahama, 1994). En peces se ha observado que las células de Sertoli conservan la capacidad proliferativa hasta el estado adulto (Schulz et al., 2005). A su vez, un mayor número de células de Sertoli potenciará la cantidad de células germinales totales, aumentando el tamaño de la gónada, lo cual se verá reflejado en la proporción de este órgano respecto al cuerpo. Esta proporción se puede evaluar con el índice gonadosomático (GSI) (Yamaguchi et al., 2006).

Aún se desconoce la regulación de la proliferación de células de Sertoli en peces. En mamíferos se ha observado que la estimulación de la proliferación de células de Sertoli

ocurre por la hormona folículo estimulante (FSH). En pez gato africano (*Clarias gariepinus*) se ha descrito que un aumento de la expresión de Fsh o su receptor, corresponde con cambios en la proliferación de células de Sertoli durante el crecimiento testicular asociados a una estimulación por Fsh y andrógenos (Schulz et al., 2003).

1.3. Control hormonal de la espermatogénesis en peces teleósteos

El desarrollo reproductivo de los teleósteos requiere un control neuro-endocrino regulado a través del eje cerebro-hipófisis-gónada (CHG) (Fig. 3) (Muñoz-Cueto, 2009). El cerebro es el centro de integración de estímulos externos, es decir, interacciones sociales o estímulos ambientales, que son percibidos por receptores sensoriales, principalmente los ojos y la glándula pineal (Muñoz-Cueto, 2009). Los estímulos percibidos desencadenan reacciones que se transmiten a través del eje CHG, encargado de la síntesis y secreción de hormonas estimuladoras y/o represoras (Fig. 3). La regulación del proceso reproductivo es importante para que la puesta ocurra en un determinado momento, maximizando la eficiencia en la reproducción y asegurando la supervivencia de la prole (Muñoz-Cueto, 2009).

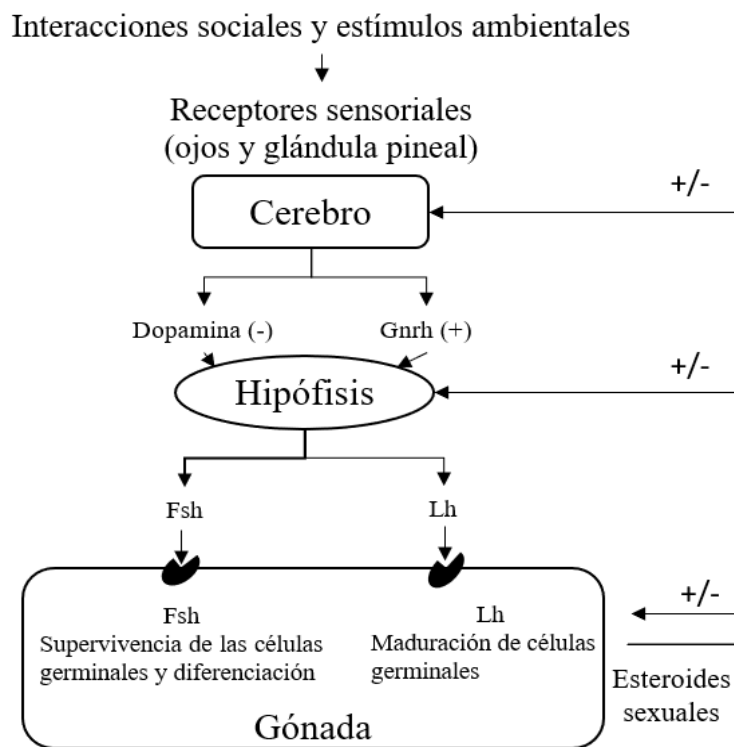


Figura 3. Esquema simplificado de la regulación neuro-endocrina en el eje cerebro-hipófisis-gónada en peces teleósteos. GnRh: hormona liberadora de gonadotrofinas; Fsh: hormona folículo estimulante; Lh: hormona luteinizante; Esteroides sexuales. Símbolos (-) inhiben, (+) estimula. Adaptado de Todd et al. (2016).

Las señales externas integradas y traducidas por el cerebro, actúan sobre el hipotálamo donde se liberan neurohormonas como la hormona liberadora de las gonadotrofinas (Gnrh) y la dopamina que actúan estimulando y reprimiendo respectivamente la síntesis y secreción de hormona folículo estimulante (Fsh) y hormona luteinizante (Lh) en hipófisis. Estas hormonas, llamadas gonadotrofinas (GTHs), circulan por el torrente sanguíneo y estimulan la producción de esteroides sexuales en las células de Leydig y de Sertoli situadas en las

gónadas (Schulz et al., 2009). La acción de las gonadotrofinas junto con los esteroides sexuales contribuyen a la diferenciación y maduración de los gametos (Moles, 2011). A su vez, los esteroides sexuales ejercen una regulación mediante retroalimentación positiva (estimulación) o negativa (represión) sobre los órganos del eje CHG (Fig. 3). Esta retroalimentación afecta en la síntesis y secreción de gonadotrofinas y Gnrh, dependiendo de la etapa de desarrollo gonadal del organismo (Zohar et al., 2010).

1.3.1. Cerebro – Neuropéptidos

El cerebro es el órgano encargado en desarrollar funciones receptoras e integradoras de los estímulos externos. La glándula pineal es una parte del cerebro que percibe los cambios lumínicos. El cerebro coordina y transmite las señales hacia el resto del sistema reproductivo (Muñoz-Cueto, 2009). El hipotálamo es un área del cerebro fundamental en el control de la reproducción, encargado de sintetizar neuropéptidos como Gnrh, dopamina, kisspeptinas y neuropéptido Y (NPY) que actuarán estimulando o reprimiendo el desarrollo gonadal (Levavi-Sivan et al., 2010).

La Gnrh es considerada la principal hormona desencadenante de la síntesis y secreción de gonadotrofinas en la hipófisis, mientras que la dopamina reprime estas respuestas. En peces se han encontrado distintos tipos de Gnrh, codificadas por diferentes genes. Particularmente en lubina existen tres, Gnrh-1, Gnrh-2 y Gnrh-3, producidas por distintas áreas funcionales del cerebro (Muñoz-Cueto, 2009), siendo la forma Gnrh-1 la más abundante en la hipófisis (González-Martínez et al., 2002), y la principal en actuar sobre la producción y secreción de gonadotrofinas (Muñoz-Cueto, 2009).

1.3.2. Hipófisis – Gonadotrofinas

La hipófisis es un órgano localizado en la base del cráneo, compuesto por un tejido nervioso llamado neurohipófisis con células neurosecretoras, y un tejido endocrino, la adenohipófisis, con células secretoras no nerviosas. La adenohipófisis se divide en dos regiones: la *pars intermedia* (PI) y la *pars distalis* (PD) que, a su vez, se subdivide en *pars distalis rostral* (PDR) y *pars distalis proximal* (PDP). La PDP contiene células gonadotropas, es decir, sintetizan gonadotrofinas Fsh y Lh (Levavi-Sivan et al., 2010).

Estructuralmente, las gonadotrofinas, Fsh y Lh, son heterodímeros, es decir, poseen dos subunidades diferentes que están unidas de forma no covalente. Estas subunidades se denominan alfa y beta, y se pueden distinguir por su peso molecular, secuencia de aminoácidos y conservación filogenética (Mateos et al., 2002). La subunidad alfa tiende a estar muy conservada y es común para la Fsh y Lh, mientras que la subunidad beta es específica para cada una de las gonadotrofinas (Levavi-Sivan et al., 2010).

En peces teleósteos el cerebro inerva directamente la adenohipófisis, a diferencia de los tetrápodos que poseen un sistema vascular que conecta estos dos órganos (Levavi-Sivan et al., 2010). La Gnrh actúa directamente sobre los receptores de membrana localizados en la adenohipófisis, y desencadena una cascada de señales que finaliza en la liberación de gonadotrofinas al torrente sanguíneo, para su posterior acción sobre las gónadas (Levavi-Sivan et al., 2010).

Mediante técnicas inmunocitoquímicas realizadas en salmónidos, se ha observado la existencia de células Fsh inmunorreactivas, sin detectar células Lh durante etapas pre-espermatogénicas. Durante la espermatogénesis fue posible detectar células Lh

inmunorreactivas, pero con una mayor proporción de células Fsh. Sin embargo, durante la espermiación la proporción de células Lh es mayor que la de Fsh (Nozaki et al., 1990). En Salmónidos, los niveles de Lh en plasma son muy bajos durante el comienzo del desarrollo testicular, es decir, durante la proliferación de espermatogonias, y aumenta cuando las células se encuentran en división meiótica (Schulz 2009). Por lo tanto, la Fsh actúa principalmente durante las etapas tempranas de la espermatogénesis, mientras que la Lh actúa en las etapas finales de este proceso (Zohar et al., 2010).

1.3.3. Gónada – Esteroides sexuales

La gónada es el órgano donde se lleva a cabo la espermatogénesis. En peces se sugiere que las células de Leydig regulan la génesis de esteroides 11-KT y dihidroxiprogesterona (DHP) a través de la estimulación por hormonas Fsh y Lh, mientras que las células de Sertoli se regulan principalmente por Fsh (Mateos et al., 2001; Schulz, 2009). La Fsh también actúa bloqueando la síntesis de factores inhibidores de la espermatogénesis, como la hormona anti-mülleriana (Amh) producida en células de Sertoli (Miura et al., 2002), promoviendo el avance de la espermatogénesis. Esta respuesta puede variar dependiendo de la expresión génica, síntesis y secreción de gonadotrofinas, regulado a través del eje CHG por acción de los esteroides sexuales (Muñoz-Cueto, 2009).

Los receptores de GTHs se encuentran en las gónadas. En mamíferos, los receptores de LH se encuentran en las células de Leydig y los de FSH en las de Sertoli. Sin embargo, en algunas especies de peces, se han observado receptores de Lh (Lhr) y de Fsh (Fshr) en células de Leydig que estimulan la producción de esteroides sexuales (Miwa et al., 1994; Yan et al., 1992). Por otra parte, los Fshr modulan la actividad de las células de Sertoli, incluyendo la estructura, nutrición y regulación paracrina del desarrollo de las células germinales (Schulz, 2009; Molés et al., 2011b). La expresión génica de ambos receptores, Fshr y Lhr, varía a lo largo del ciclo reproductivo en respuesta a cambios en los niveles plasmáticos de GTHs y esteroides. Además, en algunas especies de teleósteos el Fshr es promiscuo, ya que se ha observado en experimentos *in vitro*, que puede estimularse tanto por Fsh como por Lh homólogas. Mientras que el Lhr solo se estimula por Lh en todas las especies estudiadas hasta el momento. (Levavi-Sivan et al., 2010). En lubina, cada GTH activa de forma específica su propio receptor (Molés et al., 2011).

En teleósteos, los esteroides sexuales 17 β -estradiol (E2) y 11-KT son el principal estrógeno y andrógeno que promueven las funciones ováricas y testiculares, respectivamente. Andrógenos, estrógenos y progestágenos son producidos por las gónadas a partir de una única molécula en común, el colesterol, localizado en el exterior de la membrana mitocondrial y transportado por la proteína StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) al interior mitocondrial. La esteroidogénesis comienza con la conversión de colesterol a pregnenolona por acción de la P450_{scc} (citocromo P450 de escisión de la cadena lateral de colesterol) (Fig. 4) (Todd et al., 2016). Luego esta molécula sufre una serie de transformaciones a intermediarios implicados en distintas fases de la reproducción (Schulz, 2009). Existe una estrecha relación entre E2 y 11-KT, ya que ambos dependen de la bioconversión de la testosterona (T) por la vía de aromatasa y de 11 β -hidroxilasa/11 β -hidroxisteroide dehidrogenasa respectivamente (Todd et al., 2016).

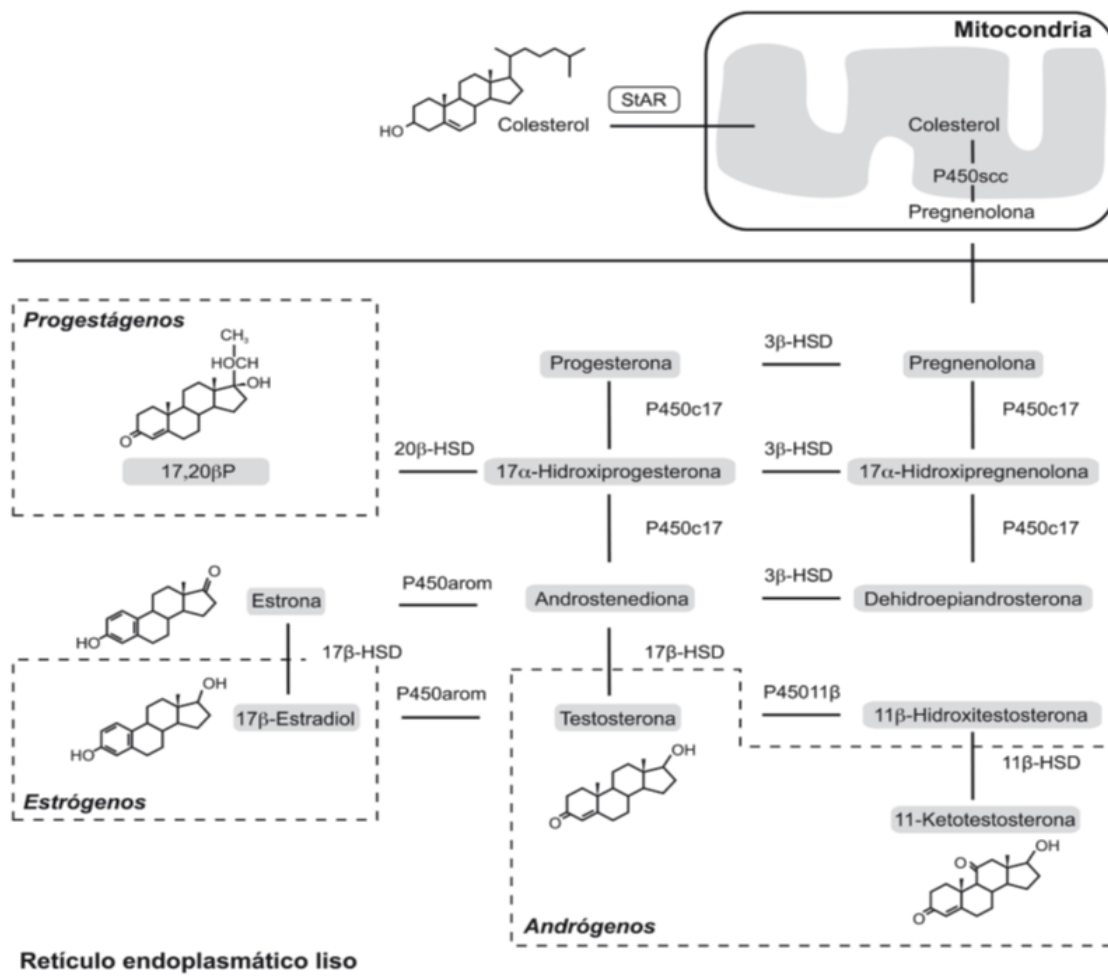


Figura 4. Ruta de la biosíntesis para esteroides gonadales en peces teleósteos. La molécula inicial es el colesterol, el cual sufre una serie de transformaciones para convertirse en un andrógeno, estrógeno o progestágeno. Líneas punteadas delimitan los esteroides más relevantes en peces. Recogido de Molés, (2011b).

Los niveles plasmáticos de esteroides fluctúan a lo largo del desarrollo testicular, mostrándose un aumento de andrógenos, T y 11-KT, inducido por un aumento en los niveles plasmáticos de Fsh en las etapas iniciales de la espermatogénesis, alcanzando valores máximos durante la preputa (Todd et al., 2016). Posteriormente, durante la espermiación, ocurre un descenso de andrógenos y un aumento de progestágenos o esteroides inductores de maduración (MIS), potenciados por la acción de la Lh. El efecto de los progestágenos es necesario para la espermiación y maduración final de los espermatozoides (Schulz, 2009). Por otro lado, los estrógenos son considerados como hormonas sexuales femeninas ya que promueven el desarrollo de oocitos, sin embargo, se han observado pequeñas concentraciones plasmáticas de E2 al comienzo del ciclo reproductivo de salmónidos machos (Schulz, 2009).

Se han descrito dos subtipos de receptores nucleares de andrógenos (Ar) expresados en las gónadas, en las células de Sertoli e intersticiales, pero no en células germinales, por lo tanto, se estima que los andrógenos actúan a través de las células somáticas (Schulz, 2009). A través de sus receptores, los andrógenos T y 11-KT influyen sobre la expresión génica testicular estimulando o inhibiendo la expresión de genes involucrados en la regulación de espermatogénesis y esteroidogénesis (Todd et al., 2016). Esta regulación es específica, es

decir, algunos genes son regulados por T y no por 11-KT y viceversa (Todd et al., 2016), dependiendo del estado de maduración, ya que los niveles plasmáticos de andrógeno fluctúan (Schulz, 2009).

Existen tres tipos de receptores nucleares de estrógenos (Er) presentes en peces, Er1, Er2a y Er2b, cuyos genes se expresan en los testículos, tanto en las células somáticas como en las germinales haploides (Miura et al., 1999), sugiriendo que esta hormona interviene en la regulación de la expresión de genes testiculares (Schulz, 2009). Sin embargo, se desconocen los mecanismos y vías de señalización de los estrógenos sobre el desarrollo gonadal (Pinto et al., 2006). En estudios donde se han utilizado implantes de E2, se han observado efectos perjudiciales sobre la fertilidad, inhibición de la síntesis de andrógenos e interrupción de la retroalimentación sobre el eje CHG, afectando a la liberación de GTHs (De Waal et al., 2009). Por otra parte, la administración de E2 en pez cebra (*Danio rerio*) mostró que este esteroide regulaba la expresión testicular de genes implicados en la esteroidogénesis, y especialmente en la proliferación y diferenciación de StgA und (Alsop et al., 2008). En medaka (*Oryzias latipes*), la administración de dosis bajas del análogo etinilestradiol estimula los efectos de los estrógenos en la renovación de células germinales, mientras que dosis altas desencadenan un efecto inhibitor (Song & Gutzeit, 2003).

Los progestágenos poseen receptores en el núcleo. Estos esteroides se relacionan con la entrada de las StgB en meiosis y con las fases finales de la espermatogénesis, coincidente con altos niveles plasmáticos del progestágeno DHP, hormona considerada inductora de la maduración (MIH) en machos (Miura et al., 2006). En algunos teleósteos, como la anguila, se sugiere que existen receptores de progesterona en el espermatozoide, y se relaciona con su motilidad. Se ha observado un aumento de pH en el plasma seminal provocado indirectamente por la presencia de DHP (Miura & Miura, 2003), al igual que picos en los niveles plasmáticos de DHP durante la proliferación espermatogonial (Schulz, 2010).

La retroalimentación ejercida por los esteroides sexuales tiende a producir una respuesta inhibitoria sobre el eje CHG, bloqueando la liberación de Lh (Billard et al., 1976, 1977). La T tiene un efecto negativo sobre la expresión del gen *fsh β* en anguila europea (*Anguilla anguilla*) (Schmitz et al., 2005), mientras que en lubina la T tiene un efecto positivo sobre los niveles hipofisarios y cerebrales de Gnrh (Zanuy et al., 1999), pero inhibe la síntesis de GABA, determinante para la liberación de GTHs (Mazón, 2014). Por otra parte, el E2 estimula la síntesis de GABA y Gnrh en anguila europea (Schmitz et al., 2005), además, tanto T como E2 ejercen una retroalimentación positiva sobre la expresión de *lh β* , mientras que para *fsh β* la retroalimentación es negativa en la pituitaria (Mateos et al., 2002).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Durante la época de verano ocurre la renovación por mitosis de las espermatogonias A y se presume que el estradiol puede ser un factor desencadenante de esta proliferación. Estudios anteriores han demostrado que el estradiol promueve la mitosis celular (Miura et al, 1999; De Waal et al., 2009); por esto pensamos que el estradiol puede ser un factor desencadenante para la proliferación.

Para poder comprobar esta hipótesis, se ha realizado un estudio, cuyo objetivo principal es conocer el efecto del estradiol sobre los testículos en machos de lubina al comienzo de la gametogénesis (mes de junio) a nivel paracrino y endocrino.

2.2. Objetivos específicos

1. Observar el efecto del estradiol sobre la morfología y estructura gonadal.
2. Analizar el efecto del estradiol sobre la expresión de los genes *lhβ* y *fshβ* en hipófisis.
3. Determinar la respuesta de síntesis (contenido en hipófisis) y secreción (niveles plasmáticos) de las gonadotropinas Fsh y Lh bajo un aumento de los niveles circundantes de estradiol.
4. Evaluar el efecto del estradiol sobre la secreción de esteroides sexuales, T y 11-KT, relevantes durante la espermatogénesis.

3. Materiales y métodos

3.1. Diseño experimental y animales

El experimento se llevó a cabo en el Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (IATS) con 34 lubinas macho de 2.5 años y un peso medio de 473 ± 64 g. Estas lubinas se obtuvieron de la empresa Piscimar, Burriana, y se criaron en el Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (Costa este de España, 40°N 0°E).

Los peces se pesaron e individualizaron mediante marcaje con pit-tag (Fish Eagle PIT tags, USA) antes de comenzar el experimento, y se dispusieron en tanques limpios de 50 litros, con agua de mar a 18 – 20 °C y aireación en circuito abierto. Durante el experimento se alimentaron con pienso comercial de la marca BioMar (Efico YM 558 de 4.5 mm) 2 veces al día y se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo natural. Se establecieron tres grupos experimentales (Fig. 5): Sacrificio inicial (grupo Sacrificio inicial) (n=10) para obtener un punto inicial de observación del estado de gónadas e hipófisis; control no tratado (grupo Control) (n=12) que consistía en la incorporación de implantes de silicona sin estradiol; y grupo experimental (grupo E2) (n=12) implantados con silicona conteniendo estradiol. Los implantes se administraron intraperitonealmente. El tamaño del implante se determinó según el peso de cada ejemplar, considerando una concentración de estradiol igual a 5 mg E2/cm implante y una dosis estandarizada previamente de 25 µg E2/g de pez.

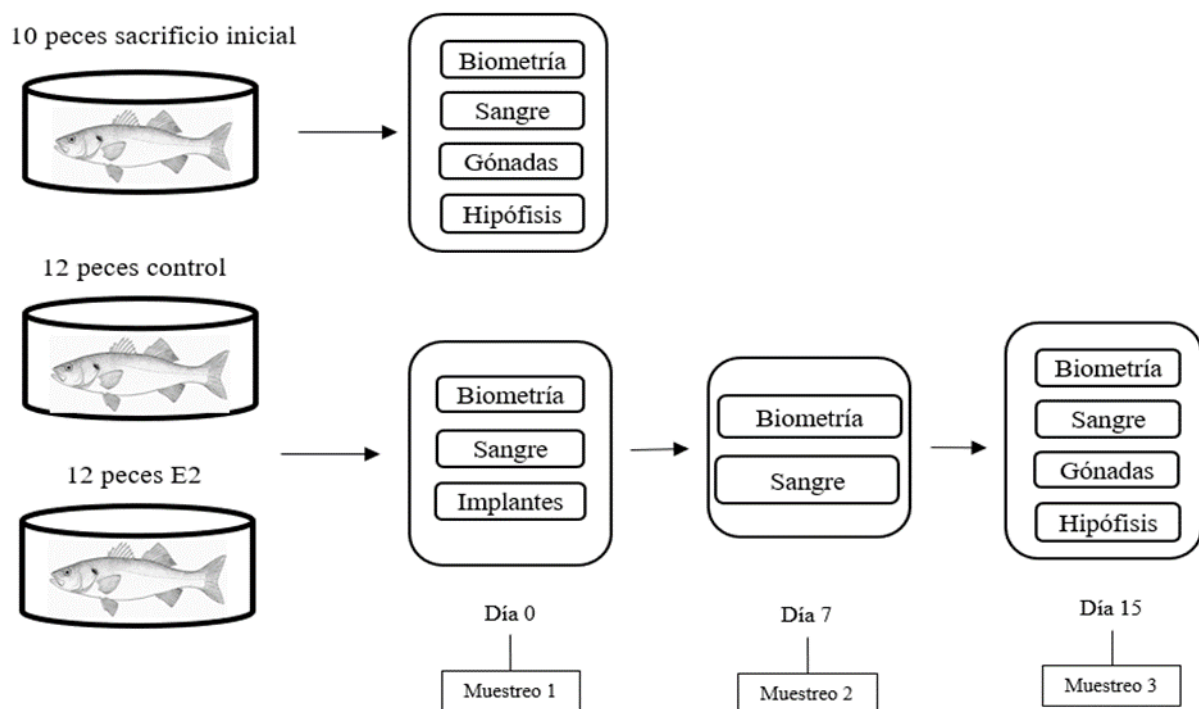


Figura 5. Esquema explicativo del modelo experimental realizado.

El experimento se llevó a cabo durante 15 días a partir del día 3 de junio, cuando se implantaron los peces, hasta el 18 de junio del año 2019, realizando muestreos cada 7 días (Fig. 5). Previo a cada muestreo los peces fueron anestesiados con MS-222 (mesilato de tricafna, Sigma, USA). Las extracciones de sangre se realizaron cada 7 días con jeringas heparinizadas de 1 ml y agujas de 0.6 x 25 mm, de la cual se extrajo el plasma para medir GTHs y esteroides. Se sacrificaron ejemplares tanto en el punto inicial como al final del

experimento. A los animales sacrificados se les extrajo las gónadas, que se separaron en tres partes: análisis histológico, inmunohistoquímica, y otra parte se guardó en tubos estériles de 1.5 ml a -80 °C para extracción de RNA. También se retiraron las hipófisis y se guardaron en tubos estériles de 1.5 ml a -80 °C para análisis de proteínas y extracción de RNA. Las muestras para histología se fijaron en viales con glutaraldehído 1%, mientras que para inmunohistoquímica se fijaron en casetes con paraformaldehído 4%.

Los animales se trataron de acuerdo con las regulaciones española (Real Decreto 53/2013) y de la Unión Europea (2010/63/EU) para el cuidado de animales usados en experimentación.

3.2. Análisis hormonales

La determinación de hormonas esteroideas y gonadotrofinas en plasma se realizó con test de EIA (*Enzyme Immunoassay*) y de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) respectivamente. Para ello se purificó el plasma por centrifugación (2500 g durante 30 minutos a 4 °C) a partir de la sangre recolectada en los muestreos. La extracción de esteroides sexuales se realizó por medio de una secuencia de centrifugaciones a 4 °C (3 veces a 3000 g durante 15 minutos) utilizando metanol (Merck, USA) como disolvente. Posteriormente, éste se llevó a evaporación para la obtención de los esteroides precipitados, que se resuspendieron posteriormente a una dilución 1/2. Para el análisis de gonadotrofinas se utilizó el plasma directamente.

3.2.1. Inmunoensayo para la detección de esteroides sexuales en plasma

Para determinar si los implantes de E2 habían variado los niveles plasmáticos de esta hormona en los peces tratados, y para evaluar el efecto de los implantes sobre la secreción de los andrógenos T y 11-KT, se determinaron los niveles de E2, T y 11-KT en plasma con un test EIA. Este test se basa en la competición por la unión a un anticuerpo primario específico entre el esteroide contenido en la muestra problema y un trazador. El trazador es la misma molécula problema, unida a un enzima que generará un color al reaccionar con un revelador (reactivo de Ellmans). Solo las moléculas de trazador que se unan al anticuerpo específico se revelarán mediante fotometría, por lo tanto, la densidad del color de revelado será proporcional a la cantidad de trazador en el pocillo, e inversamente proporcional a la cantidad de esteroide contenido en la muestra problema.

El ensayo se llevó a cabo según la metodología de Molés et al. (2011a), Cuisset et al. (1994) y Rodríguez et al. (2000) para E2, 11-KT y T respectivamente, en placas de 96 pocillos revestidos con un *coating* (200 µl/pocillo) que contiene el anticuerpo secundario Monoclonal Anti-Rabbit IgG (*y-chain specific antibody produced in mouse*) (SIGMA, USA), a una dilución 1/1800. En los pocillos se distribuyeron 50 µl de las muestras extraídas a una dilución 1/2, 1/80 y 1/20 para E2, 11-KT y T, respectivamente. Luego se distribuyeron 50 µl de trazador (SPI-BIO 482250; Cayman Chemical, Michigan, USA) (0.083 UE/ml para E2 y T; 0,1042 UE/ml para 11-KT) y a continuación 50 µl de anticuerpo primario, generados por el grupo de Fisiología de la Reproducción del IATS (dilución 1/2500000, 1/200000 y 1/10000 para E2, 11-KT y T, respectivamente). Se prepararon curvas estándar considerando entre 10-12 puntos, a partir de una concentración de 80 ng/ml hasta 2.5 ng/ml para E2, 5 ng/ml hasta 0.0097 ng/ml y 1 ng/ml a 0.0005 ng/ml de T y 11-KT, respectivamente.

Las pruebas controles realizadas para determinar mejor las concentraciones de esteroides fueron: un ligado máximo (Bo) que solo contempla trazador y anticuerpo (no existe

competición con otras moléculas); ligado no específico (NSB) para eliminar el ruido del trazador producido al unirse a las paredes del pocillo de forma inespecífica; interensayo (IE) utilizado para estandarizar distintas placas realizadas en momentos diferentes; actividad total (AT) determina la eficiencia del trazador; y blanco (N) que no contiene nada más que el reactivo de Ellmans, y por lo tanto, no debería producir ningún tipo de coloración o reacción, pues es necesario restar el ruido por una posible medición generado por los tampones durante el proceso. Las muestras se montaron según el siguiente esquema:

Tabla 1. Ejemplo de plantilla de placa de 96 pocillos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	Bo	STD3	STD7	STD11	M	M	M	M	M	M	M
B	N	Bo	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
C	N	Bo	STD4	STD8	STD12	M	M	M	M	M	M	M
D	NSB	Bo	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
E	NSB	STD1	STD5	STD9	IE	M	M	M	M	M	M	M
F	NSB	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“
G	AT	STD2	STD6	STD10	M	M	M	M	M	M	M	M
H	AT	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“	“

N: blanco; NSB: ligado no específico; AT: actividad total; Bo: ligado máximo; STD 1-12 son los puntos de la curva estándar (en T se utilizaron 10 puntos); IE: interensayo; M: muestras analizadas. Símbolos “ son replicados para obtener medias.

Las placas de E2 se incubaron durante 17 - 18 horas a 37 °C, mientras que las placas de T y 11-KT se incubaron por 17 – 18 horas a 4 °C en agitación a 140 rpm en oscuridad. Las placas se revelaron al día siguiente con reactivo de Ellmans (200 µl/pocillo) incubándose a temperatura ambiente durante 2 horas para E2 y 4 horas para T y 11-KT, en agitación a 140 rpm y oscuridad. La lectura se realizó a 405 nm durante 5 segundos en un lector de microplacas (Microplate Reader; Model 3550; Bio-Rad Laboratories, USA).

3.2.2. Inmunoensayo para la detección de gonadotrofinas en plasma e hipófisis

La determinación de gonadotrofinas Fsh y Lh en plasma e hipófisis se realizó por la técnica de ELISA. Los ensayos realizados se basan en la competición por la unión a un anticuerpo específico entre la gonadotrofina contenida en una muestra experimental en solución y una gonadotrofina purificada e inmovilizada en los pocillos. El anticuerpo primario que quede unido al pocillo será reconocido por un segundo anticuerpo conjugado con una enzima peroxidasa, que al reaccionar con el revelador genera un producto detectable, en este caso, un cambio de color que puede ser cuantificado mediante absorbancia. Por lo tanto, la intensidad del color producido será inversamente proporcional a la concentración de gonadotrofina en la muestra experimental.

Para la cuantificación de gonadotrofinas en hipófisis, se homogeneizó el tejido hipofisario en PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline*) (NaCl 137 nM, KCl 2.7 nM, Na₂HPO₄ 8 nM, KH₂PO₄ 2 nM, pH 7.4). El test ELISA para Fsh y Lh en plasma e hipófisis se realizó de acuerdo con Molés et al. (2012) y Mateos et al. (2006), respectivamente. Ambos ensayos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos revestidos de *coating*, que contenía las subunidades Fsh β (producida en baculovirus) o Lh β (producida en la levadura *Pichia pastoris*) específicas de lubina.

Para analizar las gonadotrofinas, las muestras de plasma se diluyeron a 1/4, mientras que las muestras de hipófisis se diluyeron a 1/75000 y 1/4000 para Lh y Fsh respectivamente. Se realizaron curvas estándar (10 puntos a partir de 164 ng/ml a 0.32 ng/ml para Fsh y 50 ng/ml a 0.10 ng/ml para Lh) y a continuación, tanto a las muestras como a la recta patrón se le incorporó el anticuerpo específico correspondiente a una dilución de trabajo de 1/28000 (AbLh β) y 1/16000 (AbFsh β) para Lh y Fsh respectivamente, y se incubó a 4 °C durante 16 horas. Se utilizaron controles NSB (ligado no específico), Bo (ligado máximo), interensayo (IE) y blanco (N). La distribución y montaje de las muestras en la placa se realizó con el mismo orden de las placas de EIA (Tabla 1).

Tras la incubación, las placas se lavaron con tampón de lavado (PBS con Tween-20), luego se saturaron los pocillos con albumina de suero bovino (BSA) (Sigma, A7030). A continuación, las muestras preincubadas con los anticuerpos se distribuyeron en las placas, 50 μ l/pocillo para la Fsh y 100 μ l/pocillo para la Lh. Se realizó una segunda incubación de las placas a 4 °C / 48 horas para Fsh y a 37 °C / 90 minutos para Lh. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron lavados con el tampón de lavado y luego se añadió el anticuerpo secundario GAR-HRP (anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo (GAR) conjugado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP), Bio-Rad, Laboratories, 172-1019) a una dilución 1/1000, siguiendo los mismos volúmenes de incubación utilizados para las muestras. En las placas de Fsh se llevó a cabo una incubación con el anticuerpo secundario a 37 °C durante 1 hora, mientras que para Lh se incubó durante 45 minutos a la misma temperatura. Las placas se revelaron con 100 μ l/pocillo de TMB (*peroxidase substrate solution*, Bio-Rad, Laboratories, USA), incubándose a temperatura ambiente durante 25 minutos en oscuridad. Se detuvo la reacción con ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N (100 μ l/pocillo). La lectura se realizó a 450 nm durante 3 segundos en un lector de microplaca (Microplate Reader; Model 3550; Bio-Rad Laboratories, USA).

3.3. Aislamiento de RNA, obtención del cDNA y cuantificación de expresión génica

3.3.1. Obtención y evaluación del RNA de hipófisis

El RNA de hipófisis se obtuvo por medio del método de TRIzol (Sigma, T9424), que se basa en la separación del DNA, proteínas y RNA a partir de un tejido, en este caso la hipófisis, conservada a -80 °C en tubos estériles. Se homogeneizó el tejido hipofisario en 250 μ l de PBS 1X con una jeringa de 1 ml y agujas de 0.5 x 16mm, se añadió el reactivo de TRIzol y cloroformo (PanReac) y se mezcló fuertemente durante 15 segundos. Las muestras reposaron a temperatura ambiente durante 20 minutos y luego se separaron las fases mediante una centrifugación a 4 °C / 20 minutos y 13000 g. Se conservó solo la fase acuosa superior y se añadió GlycoBlue (Ambion) que tiñe el RNA y ayuda a identificar el pellet durante el proceso de purificación. Luego se añadió 2-propanol (PanReac), se agitó y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Se eliminó el sobrenadante y se lavó con etanol 75% en agua DEPC, se repitió la centrifugación bajo las mismas condiciones. El

etanol se eliminó con una bomba al vacío y el pellet se resuspendió en 20 µl de agua libre de nucleasas a temperatura ambiente.

La integridad del RNA se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8%) en tampón TAE (0.04M Tris-Acetato, 0.001M EDTA), y se migró en un sistema de electroforesis horizontal (Bio-Rad Laboratories, Powerpac Basic) a 80 V / 30 minutos. Luego se observó en un transiluminador (Inlab, TFX-20M). La pureza de la muestra se determinó midiendo la absorbancia a 260/280 nm (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific). Se comprobó si existía contaminación de DNA genómico en las muestras de RNA mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se basa en la amplificación de una secuencia de DNA específica transcurrido una serie de ciclos repetidos de temperaturas. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización a 94°C / 1.5 minutos, seguido de 12 ciclos de 94 °C / 30 segundos, 66 °C / 30 segundos con una rampla (*touchdown*) que descendía 0.5 °C/ciclo hasta llegar a 60 °C, y una extensión a 72 °C / 30 segundos. Luego se realizaron 28 ciclos con las mismas condiciones, usando una temperatura fija de anillamiento de 60 °C. La extensión final fue en ciclo único de 5 minutos a 72 °C. Los cebadores utilizados fueron: Fshr-Forward (5' – TCA ACA GCC TGC AGC ACC TCA – 3') y Fshr-Reverse (5' - TCT CCA GCT TGT CGT TCT CCC – 3'). La PCR se llevó a cabo en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA).

Los productos de amplificación se migraron en un gel de agarosa 0.8% con TAE 1X y se corrió a 80 V / 40 minutos. Se visualizó el resultado en un transiluminador y se confirmó la presencia de DNA genómico en las muestras, por lo que tuvimos que tratar las muestras con DNasa para su eliminación.

Se trató el RNA purificado con DNasa (TURBO DNA-free Kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) bajo las instrucciones del fabricante, utilizando 1 - 2 µl de RNA como molde. Posteriormente se comprobó la inexistencia de DNA en las muestras de RNA con un gel de agarosa 0.8% (80 V / 40 minutos) cargando las muestras con tampón de carga 1/10 para RNA. Luego se volvió a cuantificar el RNA en un espectrofotómetro Nanodrop.

3.3.2. Obtención de cDNA por transcripción reversa

La síntesis de cDNA a partir de un RNA libre de DNA genómico se realizó mediante una transcripción reversa (RT). En este caso se realizó la RT con la transcriptasa inversa SSIV (SuperScript IV, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Se utilizó como sustrato 2 µg de RNA, hexámeros (100 µg/µl), cebadores y dNTPs (10 nM). A la reacción se le añadió 1 µl de RNA de Luciferasa (*luc*, 0.4 ng/µl) (Promega L4561), de manera que la amplificación de este gen se utilizó posteriormente como gen de referencia en la PCR cuantitativa (qPCR). Estos ingredientes, en un volumen total de 14 µl, se calentaron a 65 °C / 5 minutos para realizar el alineamiento de cebadores. Después de enfriar brevemente en hielo, se añadió una mezcla que contenía un inhibidor de RNasas (Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor, Promega, USA), junto con tampón de reacción 5X (Invitrogen), DTT (0.1 M) y la SSIV. Las muestras se incubaron a 23 °C / 5 minutos y luego a 55 °C / 15 minutos. La reacción se detuvo calentando a 80 °C / 10 minutos. Todo el procedimiento se efectuó en la máquina Thermal Cycler PHC-3, modelo FPHC3CR, Techne Inc.

3.3.3. PCR cuantitativo

A partir del cDNA obtenido se realizaron las qPCR para cuantificar la expresión génica de *fshβ* y *lhβ* respecto al gen de referencia *luc*, añadido previamente durante la RT. Se utilizaron técnicas de uso de marcadores fluorescentes SYBR® Green para *fshβ* y *lhβ*, y sondas TaqMan para *luc*. La técnica de qPCR se basa en la amplificación de una secuencia génica a cuya reacción se le añade un agente fluorescente (SYBR-green) o bien se utilizan sondas marcadas con fluoruros (Taqman), de manera que en los dos casos un aumento en la intensidad fluorescente indica un aumento del producto de PCR amplificado. A su vez, el aumento de la señal fluorescente en ciclos de amplificación o Ct más tempranos se relaciona con una mayor concentración de la muestra.

Todas las mediciones se realizaron por duplicado en placas semi-bordeadas de 96 pocillos (Thermo-Fast 96-well PCR Plate, Thermo Fisher Scientific) en la máquina CFX Connect Real-Time System (BIO-RAD, Singapur). Se emplearon las enzimas TaqMan® (PyroTaq Probe qPCR Mix Plus (NO-ROX) (Cultek Molecular Bioline)) para el gen de referencia y PyroTaq EvaGreen 5X qPCR Mix Plus (Cultek Molecular Bioline). Para los genes analizados se utilizó 1 µl de cDNA como molde a una dilución 1/40, cebadores (10 µM) 0,4 µl para los genes *fshβ* y *lhβ*, y 1,8 µl para el gen de referencia (Tabla 2), en un volumen total de 20 µl. La qPCR para evaluar la expresión de los genes de interés se realizó según las siguientes condiciones: Un primer ciclo de desnaturalización a 95 °C / 15 minutos, seguido de 40 ciclos que contemplan una desnaturalización a 95 °C / 15 segundos, alineamientos de cebadores con una rampla de temperaturas de 60 – 65 °C / 20 segundos y por último una elongación a 72 °C / 20 segundos.

Por otra parte, las condiciones para la qPCR de Taqman fueron las siguientes: Un ciclo de activación de la enzima a 90 °C / 15 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C / 15 segundos y finalizando con un ciclo de alineamiento y elongación a 60 °C / 1 minuto.

Tabla 2. Cebadores y sonda Taqman utilizados en la qPCR para los genes *fshβ*, *lhβ* y *luc*.

Gen	Método de detección	Secuencia (5' – 3')	Concentración (µM)	Tamaño amplicón (pb)
<i>fshβ</i>	SYBR® Green	Fw: TCGATAGTACGTGTCTGTGCT Rv: CACTTGGATGCTGATGTTGG	200 200	131
<i>lhβ</i>	SYBR® Green	Fw: AGCTCATCAACCAGACAGTG Rv: CACTTGGATGCTGATGTTGG	200 200	120
<i>luc</i>	TaqMan®	Fw: TACAACACCCCAACATCTTCGA Rv: GGAAGTTCACCGGCGTCAT pr: CGGGCGTGGCAGGTCTTCCC	900 900 200	68

Fw: cebador forward; Rv: cebador reverse; pr: sonda fluorogénica Taqman.

La expresión relativa de los genes *fshβ* y *lhβ* se determinó mediante la metodología de delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Livak & Schmittgen, 2001), basada en la resta del Ct (cycle threshold) del gen de referencia *luc* con el Ct del gen de interés (*fshβ* o *lhβ*) para una misma muestra (ecuación 1). Esto correspondería a la primera corrección o delta. Este procedimiento se realizó para todas las muestras. Luego se calculó el promedio de los valores controles, para utilizarlos como referencia en el segundo delta. Se restó el valor del primer delta con el promedio de los valores controles corregidos con el Ct del gen de referencia (ecuación 2), procedimiento que se realizó a las muestras control, tratados y al sacrificio inicial. Luego se elevó en 2 el resultado del segundo delta (ecuación 3) obteniéndose la expresión relativa de las diferentes muestras. Esta metodología considera un 100% de eficiencia de amplificación durante el qPCR y una misma eficiencia para ambos genes.

Ecuación 1: $\Delta_1 = Ct \text{ gen LUC} - Ct \text{ gen interes } (fsh\beta \text{ ó } lh\beta)$

Ecuación 2: $\Delta_2 = \Delta_1 - X \text{ control } (fsh\beta \text{ ó } lh\beta)$

Ecuación 3: $\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta_2}$

3.4. Estudio del desarrollo gonadal: GSI, histología e inmunohistoquímica

3.4.1. Cálculo del GSI

Las gónadas se extrajeron al comienzo (Sacrificio inicial) y al final del experimento (grupo Control y E2) y se pesaron para luego calcular el GSI. Este índice representa la proporción de la gónada respecto al cuerpo del pez en base al peso (g). El cálculo se realizó mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 4: $GSI: \left(\frac{\text{Peso gónada (g)}}{\text{Peso pez (g)}} \right) * 100$

Posterior al pesaje de la gónada se dividió en 3 partes: una para análisis histológico, otro para expresión de genes y una última parte para estudios de inmunohistoquímica.

3.4.2. Histología e inmunohistoquímica

Las gónadas recolectadas en los muestreos 1 (grupo Sacrificio inicial) y 3 (grupo Control y E2) se fijaron durante 24 horas a 4 °C en paraformaldehído 4% o glutaraldehído 1% para inmunohistoquímica e histología respectivamente. Posteriormente se deshidrataron en una serie de alcoholes 70 - 96%. La inclusión para histología se realizó en bloques con resina de metacrilato (Technovit 7100 y 3040, Kulzer, Alemania) mientras que para inmunohistoquímica se incluyó en parafina, en una estación de inclusión (MYR EC350).

Los cortes de histología convencional e inmunohistoquímica fueron de 4 μm, y se realizaron de forma no secuencial con un micrótopo Reichert-Jung, 1150 Autocut para la inclusión en plástico y HM 355, Microm para inclusión en parafina (Q path, VWR). A las muestras de histología se les realizó una tinción policrómica (Bennett et al., 1976) para su observación al microscopio.

Con el fin de evaluar el efecto del estradiol sobre la proliferación de espermatogonias se observó la presencia de los diferentes estadios celulares en los cortes de gónada realizados.

Se consideró el siguiente criterio para determinar el estadio de desarrollo gonadal (Begtashi et al., (2014):

- 1) Estadío I (proliferación mitótica): solo presenta StgA
- 2) Estadío II (recrudescencia temprana): entrada en diferenciación, se observan StgA y StgB
- 3) Estadío III (recrudescencia media): entrada en meiosis, presenta nuevos tipos celulares como espermatozoides I y II junto con espermátidas.
- 4) Estadío IV (recrudescencia tardía): se observan por primera vez espermatozoides maduros
- 5) Estadío V (maduración): contempla mayoritariamente espermatozoides maduros
- 6) Estadío VI (postpuesta): tras la puesta el testículo tiene un aspecto vacío de células germinales

Este experimento se realizó durante la época postpuesta, por lo tanto, se espera encontrar testículos en estadio VI – I que presentan principalmente StgA y en menor proporción StgB. La evaluación de la proliferación de espermatogonias se realizó mediante inmunohistoquímica (IHC) sobre testículos extraídos en el presente estudio y testículos ya disponibles, de un experimento preliminar de implantes de estradiol, realizado en julio de 2018. El diseño experimental del experimento realizado en julio de 2018 fue el siguiente: Se tomaron 12 machos de lubina con un peso medio de 179 ± 25 g, marcados con pit-tag, provenientes del mismo origen que los utilizados en el experimento descrito en este trabajo. A 6 de los peces se les colocaron implantes vacíos (grupo Control), mientras a los otros 6 se les introdujeron implantes con 50 μ g de E2/g de pez (grupo Estradiol). Los animales se sacrificaron tras 15 días y se tomaron muestras de sangre los días 0, 7 y 15 del experimento. Toda la metodología de este experimento se realizó según lo indicado anteriormente.

Todas las IHC se realizaron siguiendo el siguiente protocolo: Las muestras almacenadas a 4 °C se atemperaron a 35°C / 30 minutos, luego se realizó el desparafinado con la siguiente serie de lavados: xilol (2 veces), y luego etanol a concentraciones decrecientes (100, 96, 80 y 70%) para terminar en agua bidestilada (2 veces), cada inmersión se realizó durante 5 minutos. A continuación, se prosiguió con el desenmascaramiento de los epítomos de la muestra mediante calor, durante este paso ocurre la desnaturalización de las proteínas, las muestras se sometieron a 95 °C / 15 minutos en un baño con Tris-EDTA (10mM Tris Base, 1nM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9.0); posteriormente, para evitar un cambio brusco de temperatura, las muestras se atemperaron en la poyata durante 5 minutos y se prosiguió con 2 lavados con TBS-T (TBS 0.025%, Triton X-100) en agitación suave. Luego, se secaron los bordes y el reverso de los portaobjetos para delinear con un rotulador hidrofóbico el área de las muestras. Los portaobjetos se colocaron con las muestras hacia arriba en una caja oscura con papel humedecido (para generar un ambiente húmedo) y se incubaron con 350 μ l/porta de solución de saturación (TBS-T, 3% normal goat serum (NGS), 1% BSA) a temperatura ambiente durante 2 horas. Seguidamente, se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario (p-Histone H3 (Ser10)-R, Biotechnology, Santa Cruz) a una dilución 1/150 durante 17 horas a 4 °C en oscuridad. Tras las 17 horas se retiró el anticuerpo primario, se lavó 2 veces durante 5 minutos con TBS-T en agitación suave, y se incubó con el anticuerpo secundario (GAR-HRP, Bio-Rad, Laboratories, 172-1019) a una dilución 1/250 a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se lavaron 3 veces con 0.025% Triton X-100 en agitación y 1 vez con Tris-HCl 0.05 M antes del revelado con solución de diaminobencidina (DAB), que contenía 10 mg de DAB Easy tablets (Acros Organics, Ney Jersey, USA) en 10 ml de agua bidestilada y 40 μ l de agua oxigenada al 30%, protegido de la luz. Se incubó con 350 μ l/porta de la solución DAB entre 3 a 5 minutos, hasta observar una leve tinción marrón. Se detuvo la reacción retirando el DAB y

sumergiendo los portaobjetos en agua bidestilada. Luego se realizó una tinción con hematoxilina al 25% durante 5 segundos y se lavó con agua del grifo en circulación durante 5 minutos, para retirar el exceso de tinción. Posteriormente se deshidrató sumergiendo los portaobjetos en etanol 70 y 100%, luego xilol (2 veces), cada proceso se realizó durante 5 minutos. Se montaron los portaobjetos individualmente con 2 gotas de medio de montaje (DPX, Merck) y tapando con un cubreobjetos. Las muestras fueron observadas transcurridas 24 horas después del montaje.

La observación de los cortes se realizó con el microscopio Nikon Eclipse E600. Se observaron cinco campos consecutivos sin solapamiento, acción que se repitió 4 veces en un mismo portaobjeto. Las fotografías se realizaron con la cámara Jenoptik ProgRes C5.

3.5. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa GraphPad Prism para Windows (versión 5, La Jolla, California, USA) descartando los valores outliers. Los análisis de hormonas en plasma fueron realizados con un ANOVA de dos vías y un posterior test de Bonferroni con el objetivo de evaluar diferencias significativas entre el grupo Control y E2 en el tiempo, y reconocer el punto en el tiempo donde se generaba esta diferencia. Además, se evaluó si existían diferencias significativas dentro de los grupos Control y E2 con un ANOVA de una sola vía. Los análisis de hormonas en hipófisis, expresión relativa de hormonas en hipófisis y GSI se realizaron con un t-test no paramétrico para encontrar diferencias entre el grupo Control y E2. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de $p < 0.05$. En las figuras las diferentes letras indican diferencias significativas dentro de un grupo, mientras que los asteriscos simbolizan diferencias significativas entre grupos (** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$).

4. Resultados

4.1. Efecto de implantes con E2 en los niveles plasmáticos de esta hormona en lubinas durante pregametogénesis

Para evaluar la efectividad de los implantes se analizaron los niveles plasmáticos de E2 de los peces del grupo Control y E2 a lo largo del experimento. Se puede observar un aumento significativo del E2 en plasma en el grupo E2 con un máximo el día 7 (6.77 ng/ml), valor que al día 15 disminuye (4.32 ng/ml) (Fig. 6). Respecto al grupo Control, no muestra cambios significativos en los niveles plasmáticos de E2 a lo largo del experimento (0.87, 1.09 y 1.13 ng/ml los días 0, 7 y 15 respectivamente).

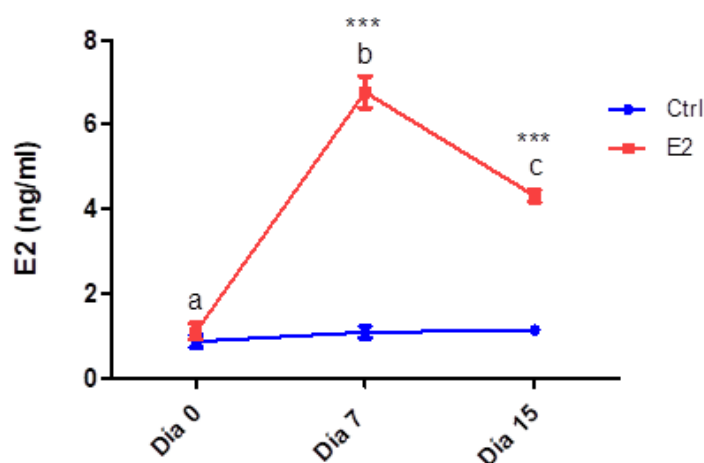


Figura 6. Niveles plasmáticos de E2 (ng/ml) a lo largo del experimento. Grupo Control (n=5) y grupo E2 (n=5). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.001$ Two-way ANOVA y posterior test de Bonferroni). Las letras minúsculas muestran diferencias significativas dentro del grupo E2 en los distintos puntos del experimento. ($p < 0.05$; One-way ANOVA con posterior test de Tukey's Multiple Comparison). Los datos están mostrados como media \pm SEM

4.2. Efecto del E2 en el desarrollo morfológico del testículo: biometría, observaciones histológicas e inmunohistoquímica

Se estudió el efecto del estradiol en el desarrollo gonadal midiendo el índice gonadosomático (GSI). A lo largo de la espermatogénesis un aumento del GSI se relaciona con un mayor desarrollo gonadal, ya que aumenta el peso de la gónada respecto al peso del pez. Durante el experimento se midió el GSI al comienzo, en el Sacrificio inicial (S1), obteniéndose un GSI medio de 0.10 %. En el sacrificio final, se observó un mayor GSI en el grupo E2 (0.10 ± 0.006 %; n=10) respecto al Control (0.09 ± 0.003 %; n=11), sin embargo, estas diferencias no son significativas (Fig. 7A).

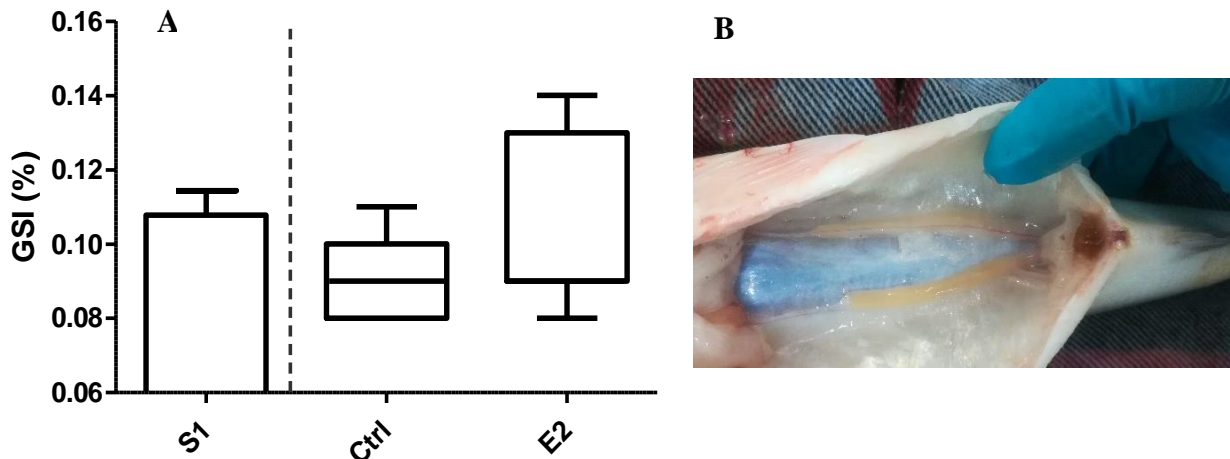


Figura 7. Desarrollo de las gónadas. (A) Índice gonadosomático (GSI) de los ejemplares de lubina: grupo Sacrificio inicial (S1) (n=9), Control (Ctrl) (n=11) y Estradiol (E2) (n=10) obtenido al comienzo (S1) y final (Ctrl y E2) del experimento. No se muestran diferencias significativas ($p < 0.05$; t-test no paramétrico). Los datos están mostrados como media \pm SEM. (B) Imagen de gónadas de un individuo del grupo Control al final del experimento.

El estudio histológico de los testículos mostró que estos se encontraban en estadio I el cual corresponde a un estado inmaduro ya que presenta solo StgA (Fig. 8A, 8B y 8C). Además, se observa un espacio intersticial muy engrosado, pues el testículo, tras finalizar la época de puesta (abril – mayo), todavía se encuentra en plena reorganización de sus lóbulos y producción de nuevas células germinales por renovación de las StgA und. Los testículos de todos los animales del experimento se encontraban en el mismo estado, y no se observaban diferencias histológicas entre los animales al principio del experimento (S1) y al final del experimento (Fig. 8A y 8B). A su vez no se presenciaron diferencias asociadas al tratamiento con E2 (Fig. 8C).

Tras no observar ninguna diferencia entre los grupos Control y E2 en la histología convencional, se decidió comprobar la existencia de diferencias en la proliferación de las StgA y/o células de Sertoli debidas al tratamiento con E2 en testículos con un mes más de desarrollo. Para ello se utilizaron los testículos de un experimento realizado en julio de 2018 ya disponibles en el laboratorio.

Según se ha comentado anteriormente los testículos utilizados en el presente experimento de junio 2019 tenían con pocas células germinales y cistes lo que podía dificultar su conteo, sin embargo, se pensó que el experimento de julio 2018, realizado un mes más tarde contaría con testículos más desarrollados, por lo tanto, esperamos encontrar un mayor número de cistes, lo que facilitaría el conteo de células germinales. Los animales implantados en julio de 2018 sí mostraron diferencias en el GSI tras 15 días de tratamiento con E2 (Fig. 9A), observándose un aumento del GSI en el grupo E2 (0.066 ± 0.0024 %; n=4) respecto al control (0.050 ± 0.0029 %; n=6). Sin embargo, en la histología no se observaron diferencias entre los grupos Control y E2 (Fig. 9B y 9C).

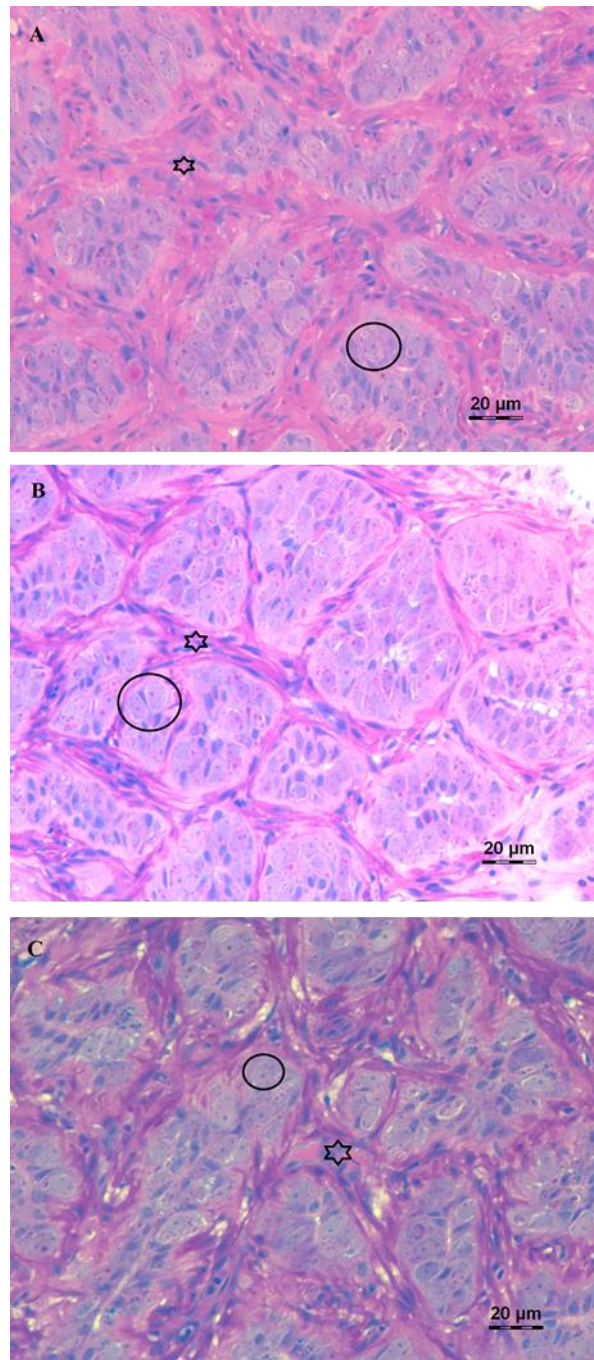


Figura 8. Preparaciones histológicas de gónadas de lubina durante junio de (A) un ejemplar del grupo Sacrificio inicial, (B) grupo Control y (C) grupo E2. Las StgA se señalan con un círculo y el tejido intersticial está con un asterisco. La barra de escala representa 20 µm.

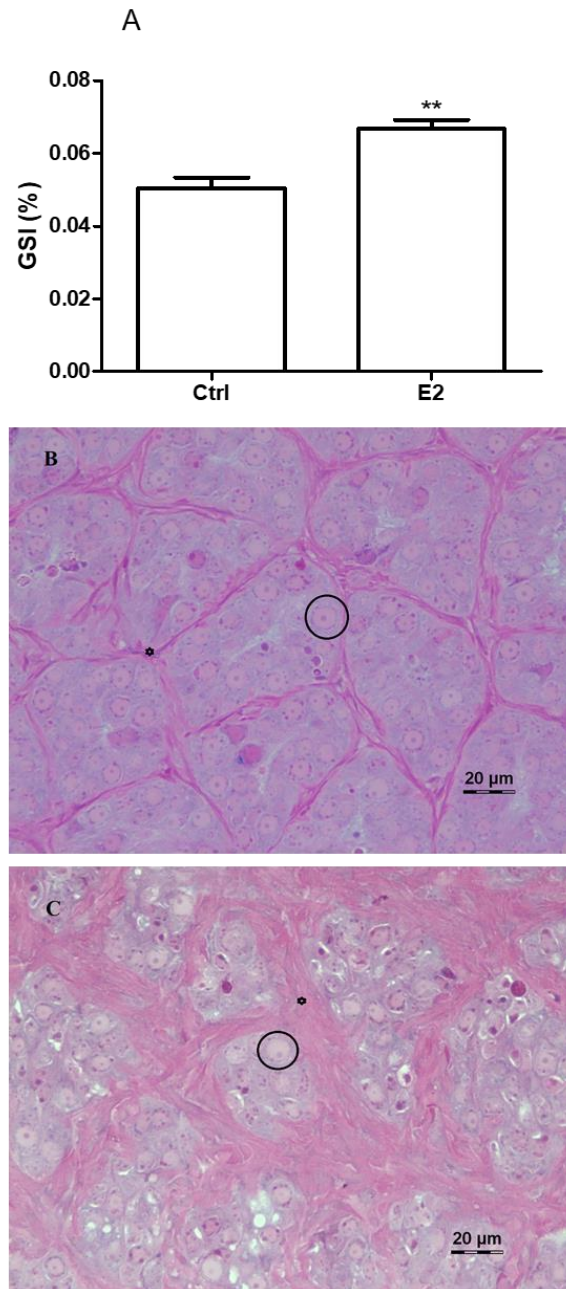


Figura 9. Desarrollo de la gónada experimento julio 2018. (A) GSI de los ejemplares de lubina para el grupo Control y E2 ($p < 0.01$; t-test no paramétrico). Los datos están mostrados como media \pm SEM. (B) Preparaciones histológicas del grupo Control y (C) grupo E2 al final del experimento. Las StgA se señalan con un círculo y el tejido intersticial está con un asterisco. La barra de escala representa 20 μ m.

La evaluación de la proliferación celular se realizó mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico que reconoce la histona 3 fosforilada en Ser 10. Esta fosforilación ocurre durante la profase de la mitosis y de la meiosis, por lo que este anticuerpo es capaz de reconocer células en división. Se utilizaron testículos del experimento realizado en julio de 2018, de los cuales se hicieron cortes histológicos de 3 animales control y 3 animales tratados con E2. Posteriormente se contaron las células que presentaban marcaje marrón. Se

obtuvieron unos valores medios de 2.67 ± 1.71 y 1.60 ± 0.99 células en mitosis para los controles y tratados respectivamente (Fig. 10). Se destaca la gran variabilidad que había entre los animales analizados, lo que indicaba que estos podían encontrarse en distintos momentos de la renovación y proliferación de StgA.

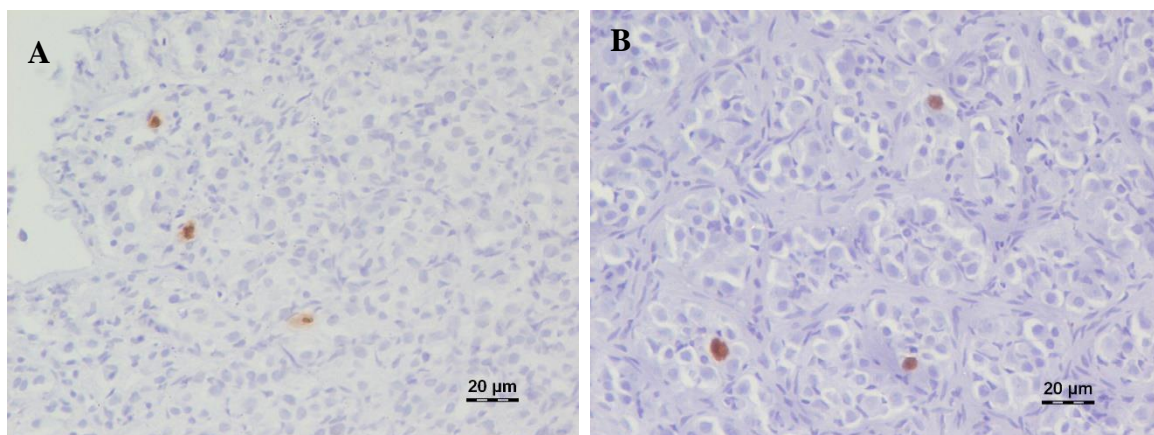


Figura 10. Inmunohistoquímica del experimento julio de 2018. Preparaciones representativas de (A) grupo Control y (B) grupo E2. Los marcajes marrones indican mitosis celular de StgA. La barra de escala representa 20 μm .

4.3. Efecto del E2 en la expresión, producción y secreción de gonadotrofinas Fsh y Lh en machos de lubina durante pregametogénesis

Tras haber comprobado la efectividad de los implantes de E2 a nivel plasmático, se evaluó el efecto de este esteroide sobre la hipófisis. Para ello, se midieron las concentraciones de Fsh y Lh en plasma e hipófisis, y la expresión relativa de los genes *fsh β* y *lh β* en hipófisis a partir del cDNA obtenido al principio y al final del experimento. Se observó una disminución estadísticamente significativa de la expresión del gen *fsh β* tras 15 días de tratamiento con E2 (0.12 ± 0.02 ng/ml; n=9), respecto al control (0.96 ± 0.15 ng/ml; n=9) y al sacrificio inicial (S1) (1.81 ± 0.40 ng/ml; n= 9) (Fig. 11A). La concentración de Fsh en hipófisis muestra diferencias significativas entre los grupos Control (94.81 ± 19.80 ng/ml; n=9) y E2 (41.01 ± 6.39 ng/ml; n=10) al final del experimento, sin embargo, ninguno de los dos grupos presenta diferencia respecto al S1 (50.93 ± 8.68 ng/ml; n=9) (Fig. 11C). Los niveles plasmáticos de Fsh se analizaron a lo largo del experimento en los dos grupos experimentales. Se observó un descenso en ambos grupos durante la primera semana de experimentación, con un leve aumento al final del experimento, pero sin mostrar diferencias significativas entre los grupos, ni a lo largo del tiempo, ni dentro de un mismo grupo (Fig. 11E).

Por otra parte, la expresión relativa del gen *lh β* muestra valores similares en el grupo E2 al final del experimento y en S1 (2.66 ± 0.4 ng/ml; n=10 y 2.58 ± 0.36 ng/ml; n=10 respectivamente), ambos significativamente mayores a los encontrados en el grupo Control tras 15 días de experimentación (0.94 ± 0.062 ng/ml; n=9) (Fig. 11B). Sin embargo, estas diferencias no se observan en las concentraciones de Lh en hipófisis (Fig. 11D). En cuanto a la secreción y presencia de la hormona Lh en plasma, si existen variaciones, notándose un aumento a lo largo del experimento en el grupo Control con un pico al día 15 (1.07 ng/ml), mientras que en el grupo E2 las concentraciones de Lh no varían a lo largo del experimento (Fig. 11F).

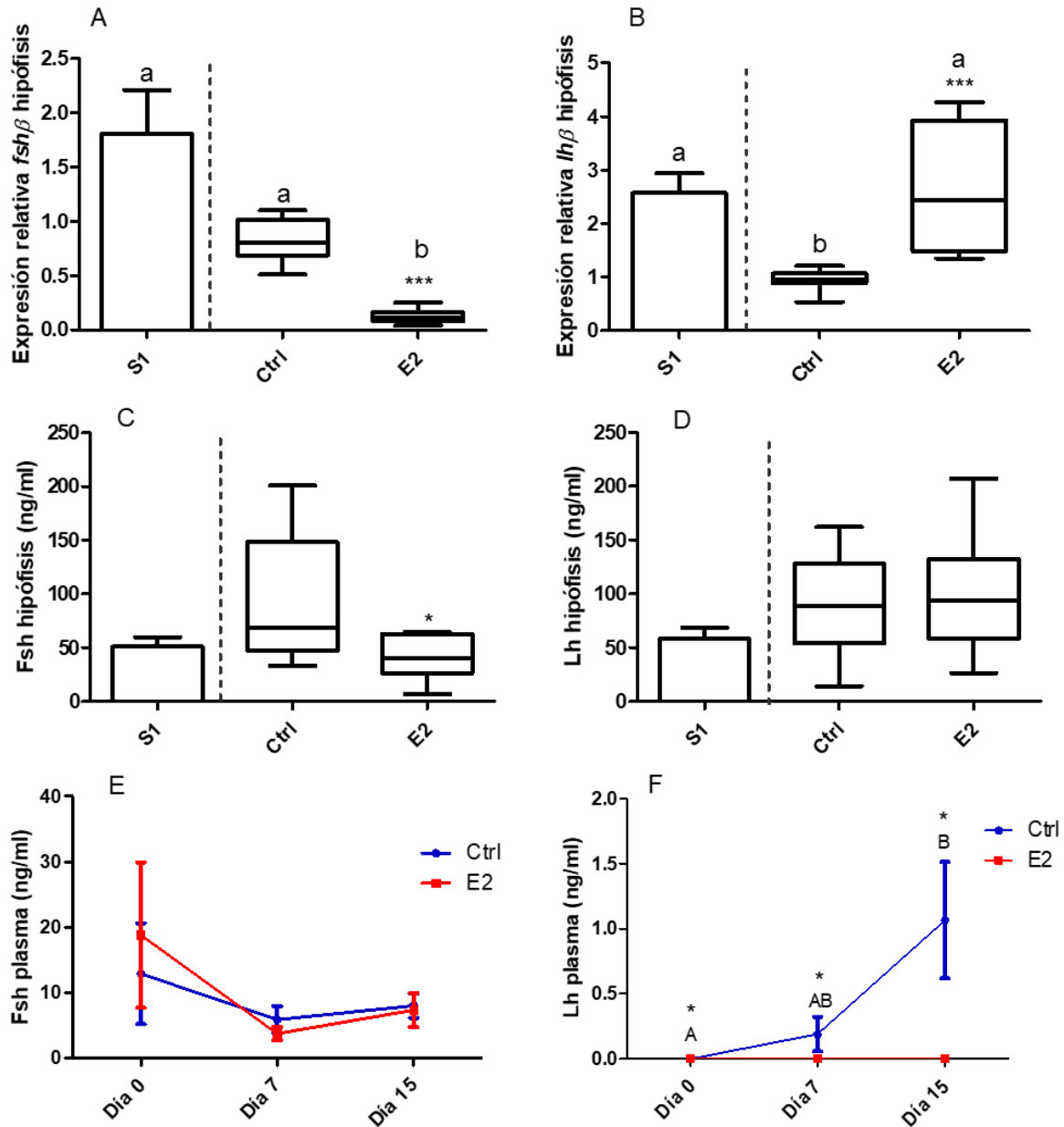


Figura 11. Expresión hipofisaria relativa de los genes *fshβ* (A) y *lhβ* (B) respecto al gen de referencia *luc* (n=9-10), y contenido de Fsh (C) y Lh (D) en hipófisis (ng/ml) (n=9 -10) del sacrificio inicial y grupos Control y E2 tras 15 días de experimentación. Los asteriscos muestran diferencias entre los grupos Ctrl y E2. Las letras minúsculas representan diferencias respecto a S1 (*** P<0.001, * P<0.05; t-test no paramétrico). Niveles plasmáticos de Fsh (E) y Lh (F) (ng/ml) en los grupos Control y E2 a lo largo del experimento (n=9-10). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos Control y E2 (p<0.05; Two-way ANOVA y posterior test de Bonferroni). Las letras mayúsculas muestran diferencias significativas entre los distintos puntos del experimento dentro del grupo Control. (p<0.05; One-way ANOVA con posterior test de Tukey's Multiple Comparison). Los datos están mostrados como media \pm SEM.

4.4. Cambios en los niveles plasmáticos de hormonas esteroideas T y 11-KT bajo el efecto del estradiol

Hemos observado que la acción de retroalimentación del E2 sobre el eje CHG provoca variaciones en los niveles de GTHs, y seguidamente queríamos analizar como influían estos cambios sobre la producción de esteroides. Para ello, se analizaron los niveles plasmáticos de T y 11-KT en el grupo Control y E2 a lo largo del experimento. Ambas hormonas muestran diferencias significativas de sus niveles plasmáticos en los distintos muestreos. La T plasmática aumenta significativamente en el grupo Control al final del experimento (día 15) (Fig. 12A) con valores de 1.77 ng/ml frente a los 0.60 ng/ml iniciales. Por otra parte, el grupo E2 presenta una disminución significativa de T (0.72, 0.45 y 0.25 ng/ml los días 0, 7 y 15, respectivamente) (Fig. 12A).

Los niveles plasmáticos de 11-KT se mantienen estables en el grupo Control a lo largo del experimento, entorno a los 0.03 ng/ml (Fig. 12B), mientras que en el grupo E2 se produce una bajada abrupta significativa de los niveles en la última semana de experimentación (0.02, 0.02 y 0.001 ng/ml en los días 0, 7 y 15 respectivamente) (Fig. 12B).

Los niveles de esteroides entre los dos grupos son significativamente diferentes solo al final del experimento, tanto para T como para 11-KT, siendo en ambos casos el grupo Control el que presenta los valores más altos y el grupo E2 valores muy reducidos (Fig. 12A y 12B).

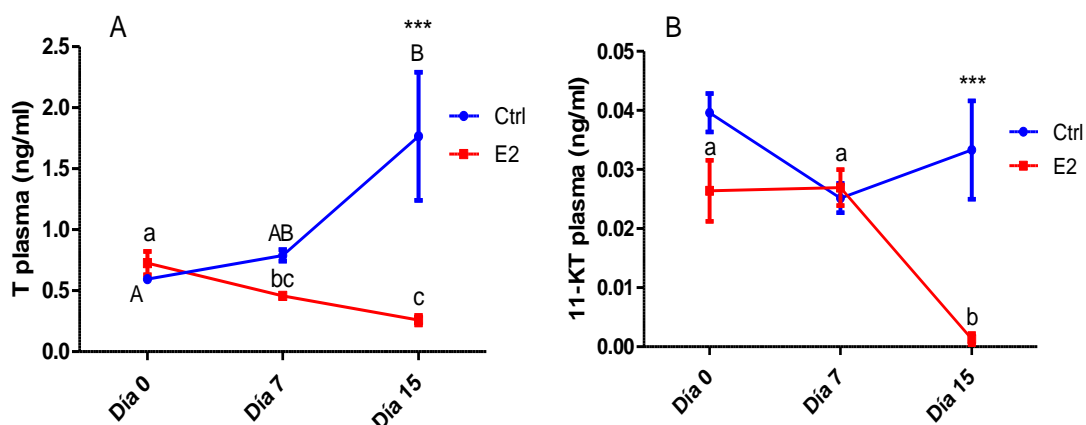


Figura 12. Niveles plasmáticos de T (A) y 11-KT (B) (ng/ml) a lo largo del experimento. Grupo Control T (n=5) 11-KT (n=8). Grupo E2 T (n=5), 11-KT (n=8). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los grupos Control y E2 en un mismo punto de muestreo ($p < 0.001$; Two-way ANOVA y posterior test de Bonferroni). Las letras muestran diferencias entre los puntos de muestreo dentro de cada grupo, las mayúsculas para el grupo Control y las minúsculas para el grupo E2. ($p < 0.05$; One-way ANOVA con posterior test de Tukey's Multiple Comparison). Los datos están mostrados como media \pm SEM.

5. Discusión

El presente estudio examinó el efecto que producen implantes de estradiol en la expresión, síntesis y secreción de gonadotropinas Fsh y Lh, además de su influencia sobre los niveles plasmáticos de andrógenos sexuales 11-KT y T.

5.1. Eficiencia de los implantes de E2

Se demostró la eficiencia de los implantes de E2 utilizados en el experimento mediante la evaluación del contenido plasmático de esta hormona. Se observó un aumento en los niveles de E2 en los peces del grupo E2 con un valor máximo de 6.77 ng/ml que se alcanzó a los 7 días de la colocación de los implantes. Los niveles plasmáticos de E2 en este grupo se mantuvieron significativamente más altos que en el grupo Control durante todo el experimento, por lo tanto, fue posible evaluar el efecto de esta hormona a lo largo del eje CHG, basándonos en la evaluación de las GTHs (Fsh y Lh) y andrógenos (T y 11-KT) en plasma.

Otras investigaciones han estudiado el rol de estrógenos en la espermatogénesis en peces. En anguila japonesa, usando implantes de E2 incorporados de forma intraperitoneal, y con dosis de 1 mg/g pez, se obtuvo un incremento en los niveles plasmáticos de E2 de hasta 7 ng/ml un día después de la implantación, valor que se mantuvo constante durante 24 días (Miura et al., 1999). Saligaut y colaboradores (1998) también obtuvieron aumentos en los niveles plasmáticos de E2 con 48 horas post implantación a una concentración de 20 mg/kg en hembras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Estudios anteriores en lubina han demostrado que implantes de E2 con dosis de 20 µg/g pez consiguen un aumento en los niveles plasmáticos de E2 alcanzando valores de 10.6 ± 1.5 ng/ml después de 12 días de experimentación (Mateos et al., 2002), también se obtuvieron niveles de E2 significativamente altos con dosis de 60 µg/g pez (Leal et al., 2009) y 50 µg/g pez, éste último en hembras adultas de lubina (Alvarado et al., 2016).

Existen otras metodologías igualmente efectivas para llevar a cabo un tratamiento con E2, como la dilución del esteroide en el agua del tanque para pez cebra (De Waal et al., 2009). Esta técnica ha demostrado tener efecto sobre la proporción de StgA y StgB, con un aumento de StgA bajo un tratamiento con 10 nM de E2 a los 21 días de tratamiento. Sin embargo, este tipo de tratamientos no es práctico realizarlos en lubina por el tamaño de los tanques y la necesidad de disponer de un circuito cerrado, además de la gran cantidad de agua contaminada que se generaría.

5.2. Determinación del desarrollo gonadal: GSI, observaciones histológicas e inmunohistoquímica

Una vez comprobada la eficiencia de los implantes de E2, se evaluó el estado de desarrollo gonadal mediante el GSI, observándose un leve aumento, pero no significativo, de este índice en el grupo tratado, por lo tanto, el E2 no tiene un efecto detectable sobre el aumento del volumen gonadal. El trabajo de Yamaguchi et al. (2006), ha demostrado que la implantación con E2 inhibe el aumento de GSI en machos inmaduros y en espermatogénesis temprana de *Pagrus major*.

Para encontrar diferencias significativas en el GSI por implantación de E2, probablemente sea necesario un mayor tiempo de tratamiento. También es posible que el estadio de desarrollo gonadal en el cual se efectuó el experimento no fuese el preciso para reconocer

las diferencias, de hecho, en un experimento similar en lubina realizado en el mes de julio de 2018, aproximadamente un mes más tarde que el experimento descrito en este trabajo, si se encontraron diferencias significativas en el GSI entre los grupos control y E2. Esto puede deberse a que el proceso de reorganización de la gónada estaba más avanzado, y existía un mayor número de cistes en los lóbulos. También puede deberse a que en este experimento de 2018 se usó una dosis más alta de E2, aunque en estas dosis tan altas se encontraron otras alteraciones dañinas en la fisiología del pez (Molés, Zapater, Gómez, datos no publicados) por lo que un aumento en la dosis no es recomendable.

Miura et al. (1999) determinaron en anguila japonesa un aumento del número de mitosis celulares de espermatogonias utilizando BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine), después de 24 días bajo un tratamiento con implantes de E2. Además, se observó la expresión de receptores de E2 en células de Sertoli, sugiriendo que el E2 es una hormona relevante en la renovación y proliferación espermatogonial. Sin embargo, la exposición a E2 en peces cebrá adultos resulta en una interrupción de la espermatogénesis en estados tempranos, mostrando una reducción, pero no la abolición, de la proliferación de StgA y B, junto con el bloqueo de la diferenciación de las StgA hacia tipo B, lo que se demostró por una acumulación de las StgA (De Waal et al., 2009).

Con objeto de ver cuál era la acción del E2 sobre la proliferación de las StgA en lubina, se tomaron testículos de animales tratados con E2 o controles correspondientes al experimento de julio 2018, ya que en éste se observa un mayor número de células germinales en histología, y además también habíamos observado una diferencia significativa del GSI entre los grupos. Tras un análisis mediante IHC de las células proliferativas no se pudo confirmar el efecto del E2 sobre la proliferación de células germinales, debido a la gran variabilidad entre individuos de un mismo grupo (Control o E2). Este problema se podría solucionar aumentando el número de réplicas para cada grupo. Alternativamente, se podrían hacer experimentos *in vitro* con fragmentos de testículo, de manera que, para un mismo testículo, y por lo tanto con un mismo basal proliferativo, se podría comparar la mitosis celular con IHC en una porción incubada con E2 y otra porción no tratada como control.

5.3. Efecto del E2 sobre la expresión, producción y secreción de gonadotrofinas Fsh y Lh en machos de lubina durante pregametogénesis

Se ha observado que los estrógenos y compuestos estrogénicos, como el E2, afectan la síntesis y secreción de GTHs (Levavi-Sivan et al., 2010). El presente estudio pretendía explorar como afectaba este esteroide a las GTHs en machos de lubina, durante la época previa al inicio de la espermatogénesis, cuando de manera natural existe un pico de E2 en el plasma de machos (Zapater, Molés, Gómez, resultados no publicados), que coincide con niveles mínimos en la expresión, contenido hipofisario y plasmático de ambas GTHs (Mateos et al., 2003; Rocha et al., 2009; Molés et al., 2012). A través de estos resultados se ha demostrado que el tratamiento continuo con E2 en machos pregametogénicos provoca una disminución significativa de la expresión del gen *fsh β* respecto al Control. Esta disminución de la expresión se refleja en un menor contenido de Fsh en hipófisis de los animales tratados, aunque los perfiles plasmáticos no presentan diferencias respecto al control. Es posible la existencia de una regulación directa del E2 sobre la expresión, síntesis y secreción de Fsh. Esta regulación se efectúa sobre la hipófisis, reprimiendo la expresión del gen codificante para la hormona, lo que genera una disminución del contenido en hipófisis, aunque no hay una repercusión sobre los niveles en el torrente sanguíneo.

Estos resultados concuerdan con los encontrados en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) inmadura, cuyo tratamiento con E2 disminuía ligeramente el contenido hipofisario de Fsh, pero no alteraba los niveles plasmáticos de la hormona (Breton et al., 1997). Dickey y Swanson (1998) también demostraron un declive en los niveles de transcripción de *fshβ* en machos de salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) tratados con implantes de E2 durante estadios tempranos de la recrudescencia gonadal.

Al igual que un estudio previo en lubina, justo al inicio de la espermatogénesis, aunque utilizando animales de ambos sexos, donde también se observó una represión de gen *fshβ* bajo tratamientos con implantes de 20 mg/kg de E2 (Mateos et al., 2002). Este mismo trabajo demostró que la inyección de un análogo de GnRh (Gnrha) no tenía efecto sobre los niveles de transcripción de *fshβ*. En otros casos, como en *Pagrus major*, no se ha visto efecto del E2 sobre la expresión de *fshβ* en machos inmaduros y al principio de la espermatogénesis (Yamaguchi et al., 2006). Por otra parte, estudios han demostrado una retroalimentación contraria, donde el tratamiento con E2 ha inducido a un incremento en los niveles de expresión de *fshβ* en pez dorado (Huggard-Nelson et al., 2002) y anguila (Zohar et al., 2009).

En el presente estudio el E2 promovió la expresión de *lhβ*, sin embargo, estas diferencias no se traducen en un mayor contenido de Lh en hipófisis, donde las concentraciones de esta hormona son similares para los tratamientos Control y E2. Por otra parte, en plasma aumenta el contenido de Lh en el grupo control al final del experimento, lo que sugiere que debe existir un mecanismo capaz de regular la secreción de Lh hipofisaria al torrente sanguíneo. De hecho, Mateos et al. (2002), en un trabajo similar en lubina, justo al inicio de la espermatogénesis, observaron un incremento en la expresión del gen *lhβ* inducido por E2, que conllevó a un aumento en la concentración de Lh en hipófisis, pero sin un incremento de los niveles plasmáticos de Lh, sugiriendo que en lubina pueda existir un mecanismo regulador de la liberación de Lh al torrente sanguíneo. Un estudio en trucha arcoíris inmadura demostró que el E2 estimula la producción de Lh en hipófisis, mientras que en plasma no se produjo ninguna variación (Breton et al., 1997). El E2 también estimuló la transcripción de la subunidad β de la Lh en machos y hembras de salmón coho (Swanson & Dickey, 1996), y en hembras anguila europea (Aroua et al., 2007) y de salmón del atlántico (*Salmo salar*) (Yadatie & Male, 2002).

Otros estudios en pez dorado muestran que el tratamiento con E2 eleva la producción de Lh mediante la estimulación de GnRh (Trudeau et al., 1991). De hecho, los efectos del E2 sobre las gonadotrofinas pueden ser por actuación directa del esteroide sobre la hipófisis, o por mediación del cerebro, que sería el órgano diana del E2 y cuyas variaciones, sobre todo en GnRh, incidirían sobre la producción de gonadotrofinas en la hipófisis (Levavi-Sivan et al., 2010). En trucha y pez dorado, tanto el E2 como la T estimulan el contenido de GnRh-3 en cerebro e hipófisis (Zohar et al., 2009). En anguila, el E2 o la combinación de E2 y andrógenos causa un incremento de la isoforma GnRh-1 en cerebro e hipófisis, mientras que la administración únicamente de andrógenos no genera un efecto significativo (Montero et al., 1995). Al ser la GnRh la hormona encargada de estimular la producción de GTHs en la hipófisis, un cambio en su producción afecta directamente sobre la síntesis y secreción de GTHs (Levavi-Sivan et al., 2010). En lubina, se demostró que la inyección de un análogo de GnRh (Gnrha) estimulaba la transcripción de *lhβ* (Mateos et al., 2002).

La regulación directa del E2 sobre la expresión de las subunidades de GTHs en la hipófisis, implica que éste actúe sobre sus genes codificantes. En ratas, se ha demostrado la estimulación de la transcripción del gen *lhβ* por interacción directa de los ER (receptores de

estradiol) con un elemento de respuesta a estradiol (ERE) situado en el promotor del gen *lhβ* (Levavi-Sivan et al., 2010). La existencia de sitios ERE en el gen *lhβ* de salmón, sugiere la posibilidad de que este esteroide pueda actuar de igual forma en peces. Recientemente se ha determinado la existencia de sitios ERE también en el gen *fshβ* en tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Mateos et al., 2002).

Independiente de una posible regulación directa o indirecta en la síntesis y secreción de Lh, no puede descartarse la existencia de modificaciones post transcripcionales en lubina, que podrían estar afectando a la síntesis de Lh en la hipófisis, lo que explicaría existencia de cantidades similares de esta hormona en hipófisis de animales controles y tratados.

5.4. Cambios en los niveles plasmáticos de hormonas esteroideas T y 11-KT bajo el efecto del estradiol

Los implantes de E2 en lubinas durante pregametogénesis disminuyeron las concentraciones de andrógenos, T y 11-KT, a los 15 días de experimentación, mostrando diferencias significativas respecto al grupo Control. Estudios similares en pez cebra demuestran que una disminución de las GTHs provocada por la administración de E2 contribuye a la disminución en la producción de andrógenos en testículos, que finalmente resulta en la interrupción de la espermatogénesis (De Castro et al., 2018). En nuestro estudio, solo la Lh sufre una disminución en sus niveles plasmáticos por acción del E2, mientras que los niveles de Fsh no varían. Por lo tanto, podríamos deducir que la acción de la Lh es la que modula la producción de andrógenos, al menos durante esta etapa del desarrollo gonadal y condiciones experimentales.

Otras investigaciones también están en línea con los resultados presentados en este trabajo, aunque con diferencias. En *Pagrus major* el tratamiento con E2 marca una disminución de los niveles plasmáticos de 11-KT en machos inmaduros y durante la espermatogénesis temprana, mientras que la T en plasma disminuye bajo los efectos del E2 únicamente durante la espermatogénesis temprana (Yamaguchi et al., 2006). Dado que los niveles plasmáticos de GTHs no sufren variaciones en este estudio, se presume que el efecto inhibitorio del E2 sobre la síntesis de 11-KT puede darse directamente en el testículo, aunque se necesitarían más estudios para conocer el mecanismo por el cual actúa el E2 sobre la síntesis de 11-KT (Yamaguchi et al., 2006).

6. Conclusión

Las conclusiones principales de este trabajo son:

- 1) Se comprobó que el tratamiento con E2 durante 15 días no genera un efecto sobre la morfología y proliferación celular en machos adultos de lubinas durante pregametogénesis
- 2) Existe una disminución de los niveles de expresión del gen *fsh β* y aumento de la expresión del gen *lh β* tras 15 días de implantación con E2 en lubinas macho adultas en pregametogénesis.
- 3) El contenido en hipófisis de Fsh disminuye por acción del E2, probablemente por la inhibición de la expresión del gen *fsh β* . Mientras, la Lh no presenta cambios respecto al grupo control. Los niveles plasmáticos de Lh son significativamente menores en los peces tratados, sugiriendo la existencia de una regulación en la secreción de esta hormona al torrente sanguíneo por parte del E2. Por contraste, la Fsh en plasma no presenta variaciones.
- 4) La concentración de los andrógenos T y 11-KT en plasma se vieron reducidos por el efecto del E2 a los 15 días de experimentación.

Estos resultados nos permiten conocer las respuestas de las GTHs y los andrógenos frente a la acción del E2, sin embargo, no nos permite entender el mecanismo concreto por el cual el estradiol actúa sobre el eje CHG.

7. Bibliografía

- 1) Alsop, D., Matsumoto, J., Brown, S., y van der Kraak, G., (2008). Retinoid requirements in the reproduction of zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 156, 51–62.
- 2) Alvarado, M.V., Servili, A., Molés, G., Gueguen, M.M., Carrillo, M., Kah, O., y 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, 3353-3365. doi: 10.1242/jeb.137364
- 3) Aroua, S., Weltzien, F. A., Le Belle, N., y Dufour, S. (2007). Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of *in vivo* and *in vitro* effects of sex steroids. *General and Comparative Endocrinology*, 153, 333-343. doi:10.1016/j.ygcen.2007.02.027
- 4) Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR). (2018). Acuicultura en España 2018 (Versión 2018). Obtenido de <https://www.apromar.es>
- 5) Barnabé, G. (1991). La cría de la lubina y de la dorada. Acuicultura, Barcelona, OMEGA S.A., pp. 573-612.
- 6) Begtashi, I., Rodríguez, L., Moles, G., Zanuy, S., y 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, 539-59.
- 7) Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W., y 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, 71-97.
- 8) Billard, R., Richard, M., y Breton, B. (1976). Stimulation de la secretion gonadotrope hypophysaire après castration chez la truite arc-en-ciel: variation de la réponse au cours du cycle reproducteur. *CR Acad Sci Paris*, 283, 171-175.
- 9) Billard, R., Richard, M., y Breton, B. (1977). Stimulation of gonadotropin secretion after castration in rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 33, 163-165.
- 10) Billard, R., Fostier, A., Weil, C., y Breton, B. (1982). Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can J Fish Aquat Sci*, 39, 15.
- 11) Breton, B., Sambroni, E., Govoroun, M., y Weil, C. (1997). Effects of steroids on GTH I and GTH II secretion and pituitary concentration in the immature rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *C.R. Acad. Sci. Paris. Sciences de la vie / Life Sciences*, 320, 783-789
- 12) Cuisset, B., Pradelles, P., Kime, D.E., Kühn, E.R., Babin, P., Davail, S., y Le Menn, F. (1994). Enzyme immunoassay for 11-ketotestosterone using acetylcholinesterase as label: application to the measurement of 11-ketotestosterone in plasma of Siberian sturgeon. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 108, 229-241.
- 13) De Castro Assis, L.H., de Nóbrega, R.H., Gómez-González, N.E., Bogerd, J. y Schulz, R.W. (2018). Estrogen-induces inhibition of spermatogenesis in zebrafish is largely reversed by androgen. *Journal of Molecular Endocrinology*, 60(4), pp. 273-284.
- 14) De Waal, P.P., Leal, M.C., García-López, A., Liarte, S., de Jonge, H., Hinfrey, N., Brion, F., Schulz, R.W., y Bogerd, J. (2009). Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a

reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in zebrafish testis. *Journal of Endocrinology*, 202, 287–297. doi.org/10.1677/JOE-09-0050

- 15) Dickey, J.T., y Swanson, P. (1998). Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of Molecular Endocrinology*, 21, 291–306
- 16) Espinoza de los Monteros J, Labarte U. (1987). Reproducción en Acuicultura. CAICYT. ISBN: 84 – 505 – 4900 - 0
- 17) Fischer, W., Bauchot, M.L., y Schneider, M. (1987). Guide Fao d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Zone de Pêche 37. FAO, Vol. 2, 1529.
- 18) González-Martínez, D., Zmora, N., Zanyu, S., Sarasquete, C., Elizur, A., Kah, O., y Muñóz-Cueto, J.A. (2002). Developmental expression of three different prepro-GnRH (Gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 23, 255-267.
- 19) Griswold, M.D. (1998). The role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell and Developmental Biology*, 9, 411-416.
- 20) Huggard-Nelson, D.L., Nathwani, P.S., Kermouni, A., y Habibi, H.R. (2002). Molecular characterization of LH- β and FSH- β subunits and their regulation by estrogen in the goldfish pituitary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 188, 171-193.
- 21) Lacerda, S.M, Costa, G.M., y de França, L.R. (2014). Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. *General and Comparative Endocrinology*, 207, 56–65.
- 22) Larsen, D.A., y Swanson, P. (1997). Effects of gonadectomy on plasma gonadotropins I and II in Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology*, 108, 152-160.
- 23) Leal, E., Sánchez, E., Muriach, B., y Cerdá-Reverter, J.M. (2009). Sex steroid-induced inhibition of food intake in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Comparative Physiology B*, 179, 77-86.
- 24) Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mañanós, E.L., Gómez, A., y Lareyre, J.J. (2010). Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 412-437. doi:10.1016/j.ygcen.2009.07.019
- 25) Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25, 402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- 26) Mateos, J., Mañanos, E., Carrillo, M., y 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*, 132, 75-86.
- 27) Mateos, J., Mañanós, E., Martínez-Rodríguez, G., Carrillo, M., Querat, B., y Zanuy, S. (2003). Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (α , FSH β and LH β) and their expression during the reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 133, 216-232. doi:10.1016/S0016-6480(03)00164-3

- 28) Mateos, J., Mañanós, E., Swanson, P., Carrillo, M., y Zanuy, S. (2006). Purificación de la hormona luteinizante (LH) en la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y desarrollo de un inmunoensayo específico. *Ciencias marinas*, 32, 271-283.
- 29) Mazón, M.J., Gómez, A., Yilmaz, O., Carrillo, M., y 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. doi:10.1095/biolreprod.113.110569
- 30) Mazón, J.M. (2014). Estudio de la función de la hormona estimuladora del folículo de lubina: su implicación en la espermatogénesis y sus rutas de señalización intracelular. Universidad de Murcia, Departamento de biología celular e histología, Murcia, España.
- 31) Miura, T., Miura, C., Ohta, T., R. Nader M., Todo, T., y Yamauchi, K. (1999). Estradiol-17 β Stimulates the Renewal of Spermatogonial Stem Cells in Males. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264(1), 230–234.
- 32) Miura, T., Chiemi, M., Yasuko, K., y Kohei, Y. (2002). Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Development*, 129, 2689-2697.
- 33) Miura, T., y Miura, C. (2003). Molecular control mechanism of fish spermatogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28, 181-186.
- 34) Miura, T., Masato, H., Yuiichi, O., Takashi, O., y Miura, C. (2006). Progesterin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel. *PNAS*, 103(19), 7333-7338. doi.org/10.1073/pnas.0508419103
- 35) Miwa, S., Yan, L., y Swanson, P. (1994). Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by in vitro ligand autoradiography. *Biology of Reproduction*, 50, 629-642.
- 36) Molés, G., Zanuy, S., Muñoz, I., Crespo, B., Martínez, I., Mañanós, E., y 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, 1171-1181. doi:10.1095/biolreprod.110.086470
- 37) Molés, G. (2011b). Caracterización biológica de las gonadotropinas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) y desarrollo de herramientas biotecnológicas e inmunológicas para su estudio. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- 38) Molés, G., Gómez, A., Carrillo, M., y 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, 70-78
- 39) Montero, M., Le Belle, N., King, J.A., Millar, R.P., y Dufour, S. (1995). Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroendocrinology*, 61, 525–535.
- 40) Moreira, F., Assis, C.A., Almeida, P.R., Costa, J.L., y Costa, M.J. (1992). Trophic relationships in the community of the Upper Tagus Estuary (Portugal): a preliminary approach. *Estuarine, Coast and Shelf-Science*, 34(6), 617-623. doi.org/10.1016/S0272-7714(05)80066-6

- 41) Muñoz-Cueto, J.A. (2009). Cerebro y reproducción en peces: bases neuronales y neuroendocrinas. La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura (Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura), pp. 25-31. Recuperado de <http://libros.csic.es>
- 42) Nagahama, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J Dev Biol*, 38, 217-229
- 43) Nozaki, M., Swanson, P., Dickhoff, W.W., Nakai, Y., Suzuki, K. y Kawauchi, H. (1990). Salmonid pituitary gonadotrophs: II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). *General and Comparative Endocrinology*, 77, 358-367
- 44) Pinto, P.I.S., Teodósio, H.R., Galay-Borgos, M., Power, D.M., y Sweeney, G.E. (2006). Identification of Estrogen-Responsive Genes in the Testis of Sea Bream (*Sparus auratus*) Using Suppression Subtractive Hybridization. *Molecular Reproduction and Development*, 73, 318-329. doi:10.1002/mrd.20402
- 45) Rocha, A., Zanuy, S., Carrillo, M., y 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, 265-275. doi:10.1016/j.ygcen.2009.03.023
- 46) Rodríguez, L., Begtashi, I., Zanuy, S., y 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 Physiology and Biochemistry*, 23, 141-150.
- 47) Saligaut, C., Linard, B., Mañanos, E., Kah, O., Breton, B., y 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, 302-309.
- 48) Schmitz, M., Aroua, S., Vidal, B., Le Belle, N., Elie, P., y Dufour, S. (2005). Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel. *Neuroendocrinology*, 81, 107-119.
- 49) Schulz, R.W., van Dijk, W., y Bogerd, J. (2003). Sertoli cell proliferation and FSH signalling in African catfish, *Clarias gariepinus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28, 223-224.
- 50) Schulz, R.W., Menting, S., Bogerd, J., França, L., Vilela, D., y Godinho, H. (2005). Sertoli Cell Proliferation in the Adult Testis-Evidence from Two Fish Species Belonging to Different Orders. *Biology of Reproduction*, 73, 891-898. doi:10.1095/biolreprod.105.039891
- 51) Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., y Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 390-411. doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.013
- 52) Song, M., y Gutzeit, H.O. (2003). Effect of 17 α -ethynylestradiol on germ cell proliferation in organ and primary culture of medaka (*Oryzias latipes*) testis. *Dev. Growth Differ*, 45, 327-337.
- 53) Swanson, P., y Dickey, J.T. (1996). Regulation of gonadotropin I by sex steroids and gonadotropin releasing hormone in coho salmon. En 3rd International Symposium on Fish Endocrinology. Hakodate, pp. 65.

- 54) Todd, E.V., Liu, H., Muncaster, S., y Gemmell N.J. (2016). Bending Genders: The Biology of Natural Sex Change in Fish. *Sexual Development*, 10, 223-241. doi: 10.1159/000449297.
- 55) Trudeau, V.L., Sioley, B.D., Wong, A.O.L., y Peter, R.E. (1991). Mechanism of sex steroids negative and positive feedback control of gonadotropin release (GTH) secretion in teleost. En Proc. of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish.
- 56) Yadetie, F., y Male, R. (2002). Effects of 4-nonylphenol on gene expression of pituitary hormones in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol*, 58, 113–129.
- 57) Yamaguchi, S., Gen, K., Okuzawa, K., Matsuyama, M., y Kagawa, H. (2006). Influence of estradiol-17 β , testosterone, and 11-ketotestosterone on testicular development, serum steroid hormone, and gonadotropin secretion in male red sea bream *Pagrus major*. *Fisheries Science*, 72, 835–845.
- 58) Yan, L., Swanson, P., y Dickhoff, W.W. (1992). A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). *Biology of Reproduction*, 47, 418-427.
- 59) Zamora, N., González-Martínez, D., Muñoz-Cueto, J.A., Madigou, T., Mañanoz-Sánchez, E., Doste, S.Z., Zohar, Y., Kah, O., y Elizur, A. (2002). The GnRH system in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Endocrinology*, 172, 105–116.
- 60) Zanuy, S., Carrillo, M., Mateos, J., Trudeau, V., y Kah, O. (1999). Effects of sustained administration of testosterone in pre-pubertal sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture*, 177, 15.
- 61) Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Elizur, A., y Kah, O. (2010). Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165, 438-45. doi:10.1016/j.ygcen.2009.04.017