



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR
E HISTOLOGÍA

**Estudio de la Función de la Hormona Estimuladora
del Folículo de Lubina:
su Implicación en la Espermatogénesis
y sus Rutas de Señalización Intracelular**

D^a. M^a José Mazón Moya

2014



Universidad de Murcia

Departamento de Biología Celular e Histología

**Estudio de la función de la hormona estimuladora del
folículo de lubina: su implicación en la espermatogénesis
y sus rutas de señalización intracelular**

M^a José Mazón Moya

2014



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Universidad de Murcia

Departamento de Biología Celular e Histología

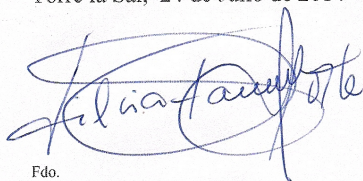
**Estudio de la función de la hormona estimuladora del
folículo de lubina: su implicación en la espermatogénesis
y sus rutas de señalización intracelular**

Memoria que presenta **Dña. M^a José Mazón Moya** para optar al grado de
Doctor en Biología por la Universidad de Murcia

La Dra. Silvia Zanuy Doste, Profesora de Investigación del CSIC, Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, Departamento de Fisiología de Peces y Biotecnología, hace constar que:

María José Mazón Moya, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección, en el Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (CSIC), el trabajo de investigación presentado en esta memoria con título: "Estudio de la función de la hormona estimuladora del folículo de lubina: Su implicación en la espermatogénesis y sus rutas de señalización intracelular", para optar al grado de doctor por la Universidad de Murcia

Torre la Sal, 24 de Julio de 2014

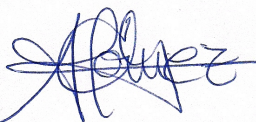


Fdo.
Dra. Silvia Zanuy Doste

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

María José Mazón Moya, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección, en el Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (CSIC), el trabajo de investigación presentado en esta memoria con título: "Estudio de la función de la hormona estimuladora del folículo de lubina: Su implicación en la espermatogénesis y sus rutas de señalización intracelular", para optar al grado de doctor por la Universidad de Murcia

Torre la Sal, de 24 Julio de 2014


Fdo.
Dra. Ana Gómez Peris

AGRADECIMIENTOS

Gracias papa, gracias mama. Gracias por apoyarme desde el principio, desde la cercanía y desde la distancia. Gracias por haberme ayudado a ser lo que soy. Gracias por ser ese cálido hogar al que siempre quiero volver y por hacerme saber que esté donde esté y haga lo que haga, siempre creeréis en mí. Eso me hace fuerte.

Gracias Juan. Por aguantar esos largos días de laboratorio. Gracias por cuidarme, por alimentar mi alma, por calmar mi desesperación. Eres un corazón gigante lleno de comprensión.

A mis directoras de Tesis, la Dra. Silvia Zanuy Doste y la Dra. Ana Gómez Peris, quiero agradecerles la oportunidad que me dieron de iniciar esta Tesis, y luego la continuidad, en el Departamento de Fisiología y Biotecnología de Peces del Instituto de Acuicultura de Torre la Sal.

Gracias a todo el equipo “becario” de Peces (Gregorio, Olivier, Vicky, Felipe, Sebastián, Rafa, José...), Nutrición (Laura, Azu, Alfonso y Gabriel), Artemios (Marta, Stella, Diana, Elena) y Patólogos (Itziar, Raquel, María), Moluscos (David) y al independiente Matu. Gracias Paula por el apoyo durante mi breve andadura en BCN, ¡mucho suerte!

Millones de gracias a Berta, ¡mi Sambrook personal!. Por tu sincera amistad, por esas paellas los domingos al sol. Por los desahogos entre semana, por los cigarros furtivos y los cafés mañaneros. Espero que haya un post-IATS y que la distancia no sea el olvido. Por mi parte no lo dudes... te echo de menos.

Gracias a ese Sol mañanero que alegra el laboratorio. ¡Hay que ponerte un monumento!

Gracias a las Dras Alicia Felip y Mercedes Blázquez. Muchos de vuestros consejos han templado arrebatos y han enfriado la mente. Os deseo un futuro lleno de buenos proyectos.

Gracias a las “chicas de oro”: Amparo, Lucinda, Elisa, María, Pepa. Gracias por ser tan estupendas.

Gracias a Charo, por ser esa gran “mami” para todos los becarios. Gracias Pepe y Miguel Ángel.

Gracias al Servicio de Animalario del IATS. Gracias a Conrado y Ximo por ayudarme en los muestreos y cuidar tan bien de los peces. ¡Habéis sido un gran apoyo!

Gracias a todo el equipo científico y administrativo del IATS.

Many thanks to Dr Takeshi Miura and Dr Chiemi Miura. Thanks for the warm welcomed and the amazing science I have learned with you. Thanks to Gersende Maugars and Fritzie Celino for taking care of me and making Japan friendlier to this gaijin.

Thanks to Dr Rüdiger Schulz for being so collaborative during and after my stay in Utrecht. Thanks to Rafael Nobrega for the great job we have done together, and Fernanda Almeida for the ISH. Good luck in your new positions! Thanks to Aristeia Magaraki, Sergio Parra and the entire Greek colony in Utrecht. Thanks for sharing beers and chats.

Thanks to my new “family” in London. Many thanks to Dr Serge Mostowy for this challenging opportunity, for being so supportive and for the advices during the final stage of this Thesis.

Gracias a mis perlas. Gracias Susi por ayudarme en los principios, que no fueron fáciles. Disfruta mucho de Sira y de tu nueva vida. Gracias a Julia, Bárbara, Cristina e Inma. Por hacer eternos e

inolvidables los fines de semana. Muchísimas gracias a Maite, mi teacher, por las traducciones relámpago... anda que no nos hemos reído rato largo con el “lost in translation”. Love u!

Gracias a mi familia. A mi abu, por llenarme el maletero todos estos años con lentejas, paellas y ese pisto tan bueno. Han sido los tapers más viajados de toda España. Gracias a mi sobri favorita, a mi sobri en desarrollo y mi hermani. Os adoro.

Gracias a M83, Beach House, Richard Hawley, Crystal Castles y tantos otros por la compañía en las largas encerronas. ¡Cuánta verdad hay en que la música amansa a las fieras!

Resumen

El proceso reproductivo en peces, al igual que en el resto de vertebrados, está regulado por una cascada hormonal en la que están implicados el cerebro, la hipófisis y las gónadas, conocido como eje CHG. Dos de las principales hormonas implicadas en el control de la reproducción son las gonadotrofinas FSH (hormona estimuladora del folículo) y LH (hormona luteinizante), ambas producidas en la hipófisis y liberadas tras el estímulo con las hormonas liberadoras de gonadotrofinas (GnRH) y con acción a nivel gonadal.

Desde la perspectiva de la producción animal en general, y de la acuicultura en particular, es esencial conocer en la especie a domesticar los mecanismos básicos de control endocrino. Este conocimiento básico es de gran utilidad para poder manipular la reproducción a conveniencia y al mismo tiempo poder desarrollar estrategias terapéuticas para solventar problemas de fertilidad que en ocasiones presentan los stocks de reproductores. Sin embargo, como consecuencia de la limitación en la disponibilidad de herramientas para su estudio, para una gran mayoría de las especies cultivables de peces se desconocen los mecanismos particulares que controlan su reproducción.

En esta Tesis se optimiza una alternativa nueva de administración de gonadotrofinas recombinantes, la tecnología conocida como transferencia génica somática. En los capítulos 3 y 4 se inyectaron adultos y juveniles de lubina con construcciones de DNA codificante de las gonadotrofinas de cadena única Lh y Fsh, respectivamente, y se evaluó el incremento de estas hormonas en el torrente sanguíneo. En ambos experimentos las inyecciones de DNA se compararon con la inyección directa de la gonadotrofina recombinante correspondiente. Estos capítulos muestran que las construcciones de DNA se incorporan a las células musculares en el lugar de inyección, y las hormonas codificadas son sintetizadas y liberadas al torrente sanguíneo.

Los capítulos 3 y 4 confirman que la transferencia génica somática es una herramienta poderosa para realizar estudios funcionales *in vivo* con gonadotrofinas, siendo además útil como terapia hormonal en peces, presentándose como alternativa a los tratamientos tradicionales con hCG o GnRH.

La funcionalidad de las hormonas recombinantes sintetizadas por las células musculares de lubina tras la incorporación del DNA, se determinó estudiando su efecto en el desarrollo de los testículos. En los capítulos 4 y 5 se evaluó como la acción de la Fsh es esencial para

iniciar el proceso de espermatogénesis, promoviendo la proliferación de las espermatogonias, siendo necesaria la acción posterior de la Lh para culminar la espermiación. Los individuos inyectados sólo con el plásmido de Fsh presentaron una espermatogénesis parcial, sin indicios de espermiación, estado que sólo alcanzaron aquellos animales que se inyectaron de manera secuencial con los plásmidos de Fsh y Lh. Estos experimentos también demuestran que la Lh por si sola no es capaz de promover la maduración testicular. Además en los análisis de expresión génica se observó que los tratamientos con Fsh incrementaron la expresión de marcadores de células germinales como *piwi*, *pcna* y *scp3*, mientras que el efecto de la Lh se detectó en enzimas esteroidogénicas como *cyp17a1* y *cyp17a2*.

En esta Tesis también se describe cómo una de las acciones más directas de la Fsh es la estimulación de la producción de 11KT. Con el fin de analizar más en detalle la acción específica de la Fsh en la activación de la esteroidogénesis, y de definir mecanismos de regulación conservados entre diferentes especies de peces, se estudió *in vitro* la acción de la Fsh en cultivo primario de testículo y ovario de lubina y pez cebra.

En el capítulo 6 se describe cómo la Fsh emplea principalmente la ruta del AMPc/PKA para transmitir su señal una vez activado su receptor, no siendo ésta la única vía, ya que también es importante la actividad de las MAPK. Haciendo uso de inhibidores y estimuladores de ambas rutas se ha perfilado un escenario en el que la Fsh utiliza de manera independiente las rutas del AMPc/PKA o las MAPK para estimular la transcripción de genes implicados en la esteroidogénesis, como *star* o *cyp19a1a*.

Listado de abreviaturas

8Br-cAMP	8-Bromo-AMPC
11-KT	11-cetotestosterona
AMPC	monofosfato de adenosina cíclico (<i>adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate</i>)
ARE	<i>androgen responsive element</i>
ATF-1	factor activador de transcripción
ATP	adenosina tri fosfato
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
BSA	albumina de suero bovino
(Bu) ₂ cAMP	dibutiril AMPC
CBT	solución Coon's con BSA
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CHG	cerebro-hipófisis-gónada
CHO-K1	células ováricas de hámster chino (<i>Chinese hamster ovary cells</i>)
CMV	citomegalovirus
CRE	elemento de respuesta a AMPC (<i>cAMP responsive element</i>)
CREB	<i>cAMP response element binding protein,</i>
CREM	proteína moduladora CRE
CTP	péptido carboxilo terminal de la subunidad beta de la hCG (<i>carbox-terminal peptide</i>)
CTP-cAMP	análogo de AMPC
DAG	diacilglicerol
DHP	17 α , 20 β dihidroxi-4-pregnen-3-ona
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
E1	estrona
E2	estradiol
E-AChE	estradiol conjugado con acetilcolinesterasa. Trazador para ensayos
EIA	enzimoinmunoensayo
Epac1 Epac2	<i>Exchange proteins activated by cAMP</i>
EPO	Eritropoyetina
ERE	<i>estrogen responsive element</i>

ERKs	quinasas reguladas por señales extracelulares
FBS	suero fetal bovino (<i>fetal bovine serum</i>)
FSH/Fsh	hormona estimuladora del folículo
Fshr	receptor de la hormona estimuladora del folículo
GABA	ácido γ amino butírico
GnRH	factor liberador de las gonadotrofinas
GnRHa	análogo de la GnRH
GPCR	receptor acoplado a proteínas G (<i>G-protein coupled receptor</i>)
G _s	proteína G estimuladora
GtH	gonadotrofina
H89	inhibidor de PKA
hCG	gonadotrofina coriónica humana
HEK-293	línea celular de riñón embrionario humano (<i>human embryonic kidney</i>)
IHNV	virus de la necrosis hematopoyética infecciosa
Ip	intraperitoneal
IP3	inositol-1,4,5-trifosfato
KT-5720	inhibidor de la PKA
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
LH/Lh	hormona luteinizante
Lhr	receptor de la hormona luteinizante
MAPk	proteína quinasa activada por mitógenos (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MEK1 / MEK2	MAP quinasa quinasa
MIF	factor inhibidor Mülleriano
MIH	hormona inductora de la maduración
MIS	sustancia inductora de la maduración
MPF	factor promotor de la maduración
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
NPY	neuropéptido Y
P450 _{scc}	citocromo P450 de escisión de la cadena lateral de colesterol
PACAP	polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria
PBS	solución salina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polimerase chain reaction</i>)
PD98059	inhibidor de la MAPK, sin definición

Pi3K	fosfatidil-inositol
PKA	proteína quinasa A (<i>protein kinase A</i>)
PKB	proteína quinasa B (<i>protein kinase B</i>)
PKC	proteína quinasa C (<i>protein kinase C</i>)
PMA	estimulador PKC (<i>Phorbol 12-Myristate-13-Acetate</i>)
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
Rap	proteínas de unión a GTP
RIA	radioinmunoensayos
RLU	unidades relativas de luz
RNA	ácido ribonucleico
Rp-cAMPs	Análogo de AMPc
RT	transcripción inversa
SBR	solución Ringer de lubina (<i>sea bass Ringer</i>)
scFsh	Fsh de cadena única (sc = <i>single chain</i>)
scLh	Lh de cadena única
SEM	error estándar de la media
SF1	factor esteroidogénico-1 (<i>steroidogenic factor 1</i>)
Sf9	células de insecto para producción de proteínas recombinantes
SSC	espermatogonia indiferenciada primordial o primaria (<i>spermatogonial stem cell</i>)
StgA	espermatogonia A temprana
StgA ₁	espermatogonia A tardía
StgB	espermatogonia tipo B
T	testosterona
Tk	timidinaquinasa
TSH	tirotrofina
U0126	inhibidor de la MAPK, sin definición
VHSV	virus de la septicemia hemorrágica viral
zfFsh	Fsh recombinante de pez cebra

Abreviaturas de genes / proteínas:

<i>11-βhsd</i>	11-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa
<i>20-βhsd</i>	20 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

<i>3-βhsd</i> / 3βHSD	3β-hidroxiesteroide dehidrogenasa/isomerasa
<i>amh</i> / Amh	hormona anti-mülleriana
<i>ar</i>	receptor de andrógeno
Areg	anfiregulina (<i>amphiregulin</i>)
Btc	betacelulina (<i>betacellulin</i>)
<i>c-fos</i>	oncogen celular fos
<i>cyp11 β</i> / Cyp11β / P45011β	11β-hidroxilasa
<i>cyp17a1</i> / P450c17a1 o Cyp17a1	17α-hidroxilasa/17,20-liasa
<i>cyp17a2</i> / Cyp17a2	17α-hidroxilasa
<i>cyp19a1a</i> / Cyp19a1a	aromatasa
EGF	factor de crecimiento epidérmico (<i>epidermal growth factor</i>)
Egfr	receptor de EGF
Epgn	epigen
<i>er2a</i>	receptor de estrógenos 2a
<i>er2b</i>	receptor de estrógenos 2b
Ereg	epirregulina (<i>epiregulin</i>)
<i>gdf9</i>	factor 9 de crecimiento y diferenciación (<i>growth differentiation factor 9</i>)
gpr54	receptor de kisspeptina
<i>gsdf</i>	factor de crecimiento gonadal derivado del soma (<i>gonadal soma derived factor</i>)
hbEgf	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
Igf1e/Igf2	factores de crecimiento similares a insulina de tipo 1 y 2 (<i>insulin-like growth factors</i>)
<i>igf1ra</i>	receptor a para el factor de crecimiento insulínico 1
<i>igf1rb</i>	receptor b para el factor de crecimiento insulínico 1
<i>igf3</i> / <i>igf1b</i>	factor de crecimiento similar a insulina 3
INSL3	factor similar a la insulina 3 o relaxina (<i>insulin like factor 3</i>)
<i>kiss</i> / Kiss	kisspeptina
L-13/l-13	proteína ribosomal y su gen codificante
LGR8	receptor de Insl3
mPRs	receptores de membrana para progestágenos
p450scc	citocromo P450 de escisión de la cadena lateral de colesterol
<i>pcna</i>	antígeno nuclear de células en proliferación (<i>proliferating cell nuclear antigen</i>)

<i>piwi</i>	<i>P</i> - <i>element induced wimpy testis</i>
<i>pr</i>	receptor de progesterona
<i>rlx3c</i>	proteína similar a relaxina 3
<i>scp3</i>	proteína 3 del complejo sinaptonémico
<i>star</i> / StAR	proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>)
Tgfa	factor de crecimiento transformante- α (<i>transforming growth factor alpha</i>)
Tgf β	factor de crecimiento transformante- β (<i>transforming growth factor beta</i>)

Listado de especies (por orden de aparición)

lubina europea (*Dicentrarchus labrax*)

salmon coho (*Oncorhynchus kisutch*)

salmón común (*Salmo salar*)

trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

pez cebra (*Danio rerio*)

tilapia (*Oreochromis niloticus*)

medaka (*Oryzias latipes*)

carpa común (*Cyprinus carpio*)

salmón Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*)

salmón keta (*Oncorhynchus keta*)

carpa común (*Cyprinus carpio*)

anguila japonesa (*Anguilla japonica*)

pez gato africano (*Clarias gariepinus*)

lenguado (*Solea senegalensis*)

salmón amago (*Oncorhynchus masou ishikawae*)

lubina americana (*Morone saxatilis*)

falso halibut del japon o lenguado japonés (*Paralichthys olivaceus*)

pez gato americano (*Ictalurus punctatus*)

dorada (*Sparus aurata*)

dorada japonesa (*Pagrus major*)

gourami azul (*Trichogaster trichopterus*)

carpín dorado (*Carassius auratus*)

hucho japonés (*Hucho perryi*)

trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*)

trucha común (*Salmo trutta*)

anguila europea (*Anguilla anguilla*)

corvina (*Micropogonias undulatus*)

Platija japonesa (*Paralichthys olivaceus*)

Rodaballo (*Psetta maxima*)

bagre de vidrio (*Kryptopterus bicirrhus*)

pejerrey (*Odontesthes bonariensis*)

mero de pintas naranjas (*Epinephelus coioides*)

tritón (*Cynops pyrrhogaster*)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 La lubina europea	1
1.2 Morfología de las gónadas en teleósteos	2
1.2.1 Origen de la gónada en lubina	2
1.2.2 El testículo en teleósteos. Espermatogénesis	2
1.2.3 El ovario en teleósteos. Oogénesis	7
1.3 Control endocrino de la reproducción	10
1.3.1 Cerebro	11
1.3.2 Hipófisis	12
1.3.3 Gónadas	14
1.4 Función de las gonadotrofinas en la gametogénesis	18
1.4.1. Acción de los esteroides sexuales durante la espermatogénesis	21
1.4.2 Acción de los esteroides sexuales durante la oogénesis	23
1.5 Control paracrino de la espermatogénesis	26
1.6 Retroalimentación del eje CHG generada por los esteroides	28
1.7 Rutas de señalización intracelular activadas por las GtHs	29
1.7.1 GtHs y proteína quinasa A	29
1.7.2 Rutas alternativas de señalización	31
1.8 Transferencia génica somática	33

Capítulo 2. OBJETIVOS 41

Capítulo 3. La terapia con un plásmido que codifica Lh genera un aumento de Lh circulante de larga duración y un incremento en la producción de esperma en la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) 47

Capítulo 4. El tratamiento *in vivo* con Fsh desencadena la espermatogénesis en el testículo de juveniles de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) 67

Capítulo 5. La Fsh, y no la Lh, inicia la espermatogénesis en lubina (*Dicentrarchus labrax*) estimulando la proliferación y diferenciación de las células germinales 93

Capítulo 6. Implicación de las rutas de señalización AMPc/PKA y MAP quinasa en la síntesis de esteroides estimulada por Fsh en dos especies de teleósteos, *Dicentrarchus labrax* y *Danio rerio* 119

Capítulo 7. DISCUSIÓN GENERAL	151
--------------------------------------	------------

Capítulo 8. CONCLUSIONES	173
---------------------------------	------------

Capítulo 9. BIBLIOGRAFÍA	179
---------------------------------	------------

ANEXO I Listado de publicaciones

ANEXO II Participaciones en Congresos

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Lubina europea (*Dicentrarchus labrax*)

Filo Chordata

Subfilo Vertebrata

Superclase Osteichthyes

Clase Actinopterygii

Subclase Neopterygii

Infraclase Teleostei

Superorden Acanthopterygii

Orden Perciformes

Suborden Percoidei

Familia Moronidae

Genero Dicentrarchus Gill, 1860

Especie Dicentrarchus labrax (Linnaeus, 1758)



1.1. La lubina europea

La lubina europea, *Dicentrarchus labrax*, es un pez de alto valor comercial que habita las aguas del mar Mediterráneo, océano Atlántico y mar del Norte. Se trata de una especie euritérmica (8-24°C), por lo que la temperatura no limita su distribución (Volckaert et al., 2008). Como la mayoría de peces es una especie gonocorista en la que, debido a la ausencia de caracteres morfológicos externos ligados al sexo, resulta difícil diferenciar machos de hembras, siendo posible sólo durante la época de puesta. Sin embargo, dado que las hembras muestran un crecimiento más rápido alcanzan tallas superiores a los machos (Carrillo et al., 1995). Su ciclo reproductivo es estacional, presentado puestas durante los meses de Diciembre a Marzo, con un período de reposo entre Marzo y Septiembre. Si bien, dado que las puestas dependen de la temperatura y de la luz (Carrillo et al., 2009), este intervalo puede cambiar con la latitud. En general, en la naturaleza, los machos alcanzan la pubertad en el segundo año de vida, mientras que las hembras lo hacen en el tercero (Carrillo et al., 1993; Rodríguez et al., 2001).

1.2. Morfología de la gónada en teleósteos

Los peces teleósteos son el grupo más numeroso y diverso dentro de los vertebrados debido a la magnífica respuesta adaptativa que les ha permitido aclimatarse a hábitats acuáticos muy diversos. Estas adaptaciones se reflejan en las diferentes estrategias reproductivas que van desde la fertilización externa hasta la interna y en una estructura gonadal muy variada (Nagahama, 1983; Moyle y Cech, 2004).

1.2.1. Origen de la gónada en lubina

La arquitectura de la gónada de la lubina, al igual que la de otros vertebrados, está formada por la asociación entre células germinales y células somáticas. Durante la diferenciación sexual, las células germinales se diferencian en oogonias o espermatogonias, para formar los ovarios o los testículos, respectivamente. En la mayoría de las especies este proceso que se inicia antes en las hembras que en los machos (Devlin y Nagahama, 2002), y los esteroides sexuales (andrógenos y estrógenos) tienen una implicación fundamental. En 1969 Yamamoto demostró que en los peces, la aplicación de andrógenos masculiniza las gónadas indiferenciadas, mientras que la de estrógenos las feminiza. Esto también se ha confirmado en la lubina europea (Blázquez et al., 1998 y 2001; Galay-Burgos et al., 2006). Además, se ha demostrado que la expresión del gen *cyp19a1a*, que codifica la enzima aromatasa responsable de la síntesis de estrógenos, aumenta antes o coincidiendo con la diferenciación sexual femenina (Blázquez et al., 2008 y 2009). La lubina es una especie gonocorista, por lo que se desarrolla exclusivamente como macho o como hembra, permaneciendo en ese estado el resto de su vida. Al igual que en la mayoría de peces, las gónadas son un órgano par, que se desarrolla y se dispone de manera bilateral. Están situadas en posición dorso-lateral, una a cada lado del mesenterio dorsal, en la cavidad peritoneal (Zanuy et al., 2009).

1.2.2. El testículo en teleósteos

En 1981 Grier describió dos tipos de testículos en los peces teleósteos atendiendo a su estructura y específicamente a la disposición de las células germinales: el tubular y el lobular. La estructura tubular se caracteriza por la presencia de una cavidad central de la que derivan túbulos hacia la periferia, encontrándose las espermatogonias en el ápex o extremo ciego. En éste, la distribución de las espermatogonias, rodeadas por células de Sertoli, se limita a la región distal, cerca de la túnica albugínea. Durante la espermatogénesis el ciste formado por la asociación Sertoli-espermatogonia avanza hacia la región de los ductos espermáticos,

en la zona central del testículo, donde tiene lugar la espermiación. En los testículos de tipo lobular, los lóbulos que lo forman se ramifican y anastomosan y albergan a los espermatocistes. En este caso, las espermatogonias se distribuyen a lo largo de todo del compartimento germinal y los cistes no experimentan ninguna migración (Grier, 1981). Este tipo testicular se ha descrito principalmente en los grupos taxonómicos menos evolucionados (Parenti y Grier, 2004). Según esta clasificación, los testículos de la lubina son de tipo lobular al estar compuestos por multitud de lóbulos separados entre sí por capas fibrosas de tejido conectivo. Los testículos son alargados y están unidos por la pared dorsal de la cavidad corporal presentando un espermiducto en la superficie medio dorsal posterior que desemboca en la papila urogenital, ubicada entre el recto y los ductos urinarios. Están organizados en dos compartimentos principales, el intertubular o intersticial y el tubular. La principal característica del compartimento intertubular es la presencia de células esteroidogénicas o de Leydig, vasos sanguíneos y linfáticos, macrófagos, mastocitos y tejido conectivo (Koulisch et al., 2002). El compartimento tubular alberga las células germinales y las células somáticas que les dan soporte, o células de Sertoli (Fig. 1.1). Las células de Sertoli son esenciales para las células germinales, pues son ellas las que determinan la capacidad espermatogénica del testículo y condicionan el tipo de espermatogénesis (Matta et al., 2002). En el caso de los vertebrados amniotas, como reptiles, aves y mamíferos, las células de Sertoli proliferan solo hasta la edad adulta, y por tanto existe un número fijo de ellas que sustenta a las células germinales en distinto estado de desarrollo y procedentes de distintos clones de células germinales. Sin embargo, en los vertebrados anamniotas (peces y anfibios) la espermatogénesis es de tipo cística (Callard, 1996), de manera que las células de Sertoli se asocian a una espermatogonia indiferenciada a partir de la cual se genera un ciste de clones, todos ellos en el mismo estado de desarrollo. Además, en peces, las células de Sertoli conservan su capacidad proliferativa incluso en el estado adulto (Schulz et al., 2005), ya que durante la fase de mitosis, al inicio de la espermatogénesis, proliferan al igual que lo hacen las células germinales que forman el ciste. Esta capacidad proliferativa se reduce cuando las células germinales entran en meiosis, y se detiene definitivamente en los cistes postmeióticos.

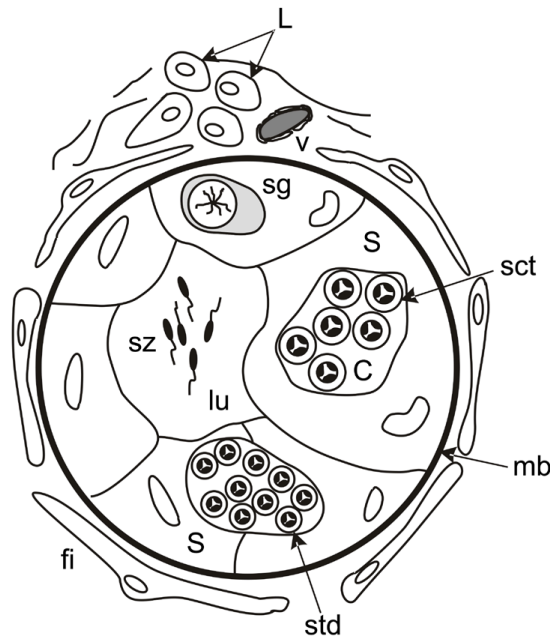


Figura 1.1. Representación esquemática de la organización de un lóbulo testicular durante la espermatogénesis. Las células de Sertoli (S) se localizan en el compartimento germinal, en contacto directo con las células germinales a las que nutren durante las distintas fases de la espermatogénesis. En el compartimento intersticial, situado entre lóbulos adyacentes, se encuentran las células de Leydig (L) y los vasos sanguíneos (v), Espermatogonias (sg), espermátidas (std), espermatozoides (sz), lumen lobular (lu), membrana basal (mb), fibroblastos, (fi). Adaptado de Billard et al. (1982).

Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación celular bien regulado en el que una espermatogonia indiferenciada primordial o primaria (SSC, spermatogonial stem cell) (De Rooij y Grootegoed, 1998) prolifera y se diferencia para finalmente producir espermatozoides maduros. En la gran mayoría de las especies la producción de espermatozoides es constante, pero en otras es un proceso cíclico y estacional que empieza a partir de estímulos ambientales y hormonales muy concretos.

En los peces las SSC experimentan dos tipos de divisiones (Fig. 1.2), las destinadas a su propia renovación que garantiza la fertilidad a largo plazo, y las divisiones que llevan a su diferenciación y están dirigidas a la formación de los espermatozoides (Miura et al., 2002b; Schulz et al., 2003). Este es un proceso complejo que está orquestado por interacciones celulares paracrinas y señales endocrinas, y organizado en tres fases principales: i) proliferación mitótica de las espermatogonias; ii) divisiones meióticas para la formación de los espermatozoides primarios y secundarios; y iii) formación de espermátidas haploides que finalmente se reestructurarán en espermatozoides (Pudney, 1995; Schulz et al., 2010).

La espermatogénesis empieza cuando una SCC experimenta un número determinado de divisiones mitóticas que dan lugar una secuencia de espermatogonias A diferenciadas y espermatogonias B, lo que resulta en una gran expansión de la población de espermatogonias. El número de generaciones de espermatogonias está genéticamente determinado (Schulz et al., 2010) por lo que el número de espermatogonias de tipo A o B varía según las especies (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Número de generaciones espermatogoniales en distintas especies de peces

Especie	Número de generaciones espermatogoniales	Referencia
<i>Dicentrarchus labrax</i>	7	Yilmaz, 2006
<i>Hucho perry</i>	6	Ando et al. 2000
<i>Salvelinus leucomaenis</i>	6	Ando et al. 2000
<i>Oncorhynchus masou</i>	8	Ando et al. 2000
<i>Carassius auratus</i>	8	Ando et al. 2000
<i>Oreochromis niloticus</i>	8	Vilela et al. 2003 Schulz et al. 2005
<i>Cheilodipterus lineatus</i>	8	Fishelson et al. 2006
<i>Danio rerio</i>	9	Leal et al. 2009
<i>Oryzias latipes</i>	8-10	Shibata y Hamaguchi, 1988
<i>Anguilla japonica</i>	10	Miura et al. 1991a
<i>Gadus morhua</i>	11	Almeida et al. 2008
<i>Poecilia reticulata</i>	14	Billard, 1969
<i>Tilapia zillii</i>	16	Fishelson, 2003

Como consecuencia de las divisiones mitóticas, las espermatogonias van cambiando su morfología, incrementando la heterocromatina y disminuyendo el tamaño celular y nuclear a medida que progresa la espermatogénesis (Zanuy et al., 2009). Conocer el número de divisiones mitóticas que experimenta una espermatogonia puede ser crucial para comprender los mecanismos que regulan la espermatogénesis (Ando et al., 2000; de Rooij y Russell, 2000). La última generación de espermatogonias generará, en la última división mitótica, el espermatocito primario en fase de preleptoteno. Estos espermatocitos inician la primera división meiótica para formar los espermatocitos secundarios, y debido a las transformaciones

morfológicas que experimentan durante la larga profase de la meiosis adquieren los nombres de espermátocitos en leptoteno, zygoteno, paquíteno y diploteno (Cobb y Handel, 1998). Una de las causas de la larga duración de esta primera profase es la intensa expresión génica que se requiere para la síntesis de proteínas específicas de la meiosis (Eddy, 1998), y de los mRNAs necesarios durante la espermiogénesis, momento en el que el genoma permanece inaccesible debido a que las histonas se remplazan por protaminas (Schulz et al., 2010) y a su empaquetamiento. Durante la espermiogénesis las espermátidas experimentan una serie de transformaciones celulares, alargándose para adoptar la forma de espermatozoide, adquiriendo flagelo, compactando al máximo su DNA en un pequeño núcleo localizado en la cabeza, y creando el cuerpo intermedio en el que se acumularán las mitocondrias. En el momento de la espermiación la pared del ciste se abre y se libera el espermato al lumen, lugar en el que adquiere la capacitación (Schulz et al., 2010).

El proceso de espermatogénesis tiene lugar enteramente en el compartimento intratubular del testículo, que es donde se localiza el epitelio germinal. Este complejo proceso requiere de un micro ambiente especial y de mecanismos muy bien sincronizados y creados principalmente por las células de Sertoli. Estas células somáticas desarrollan extensiones del citoplasma con el fin de envolver a las células germinales, lo cual es crítico para la supervivencia, proliferación y diferenciación (revisado en Griswold, 2005) de éstas. Tanto en mamíferos como en teleósteos el número de células de Sertoli determina el tamaño testicular, pues proporcionan el soporte estructural y fisiológico, y el nicho que crean controla el balance entre la renovación y la diferenciación de las células de la línea germinal (Spradling et al., 2001). Por otro lado las células de Sertoli desempeñan funciones de fagocitosis con el fin de eliminar y reciclar el espermato residual (Grier y Taylor, 1998) y los cuerpos apoptóticos (Billard, 1969; Vilela et al., 2003), supliendo la ausencia de macrófagos en el compartimento tubular de los testículos.

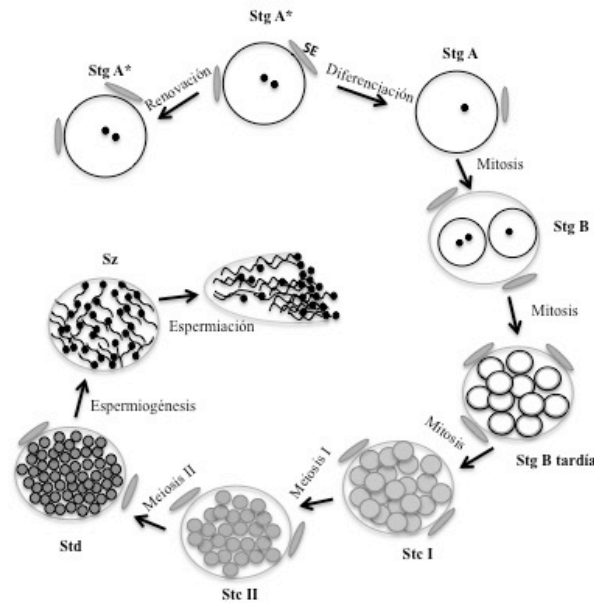


Figura 1.2. Representación del proceso de espermatogénesis en peces teleósteos. Espermatogonia A indiferenciada (StgA*), espermatogonia A (StgA), espermatogonia B (StgB), espermatocitos I (StcI), espermatocitos II (StcII), espermátidas (Std), espermatozoides (Sz); célula de Sertoli (SE). Adaptado de Molés (2011).

1.2.3. El ovario en teleósteos

En los teleósteos el ovario presenta morfologías muy variables debido a la gran diversidad de adaptaciones reproductivas existentes. No obstante, en la gran mayoría de especies el ovario es un órgano par, alargado y hueco situado en la parte dorsal de la cavidad abdominal. El ovario está constituido por tejido de soporte, o estroma ovárico de fibras de colágeno, envuelto por músculo liso y tejido vascular y nervioso. La parte central del ovario posee un epitelio germinal formado a partir de una extensión del peritoneo. La parte interna del epitelio forma unos pliegues que dan lugar a las laminillas ováricas, donde se ubican los folículos formados por el oocito y sus envolturas (Zanuy et al., 2009). Cada oocito está envuelto por una capa acelular denominada corion o zona radiata que a su vez está rodeada por una capa de células de la granulosa y una capa de células de la teca (Nagahama y Yamashita, 2008) (Fig. 1.3). Los oocitos se liberan a través del oviducto, que termina en la papila o poro genital (Wallace y Selman, 1990).

El desarrollo ovárico de los teleósteos se ha clasificado en tres tipos en función del patrón de crecimiento que presentan los oocitos (Nagahama, 1983; Zanuy y Carrillo, 1987; Wallace y Selman, 1990):

- a) Ovarios con desarrollo sincrónico, en este tipo de ovario todos los oocitos se desarrollan y ovulan al mismo tiempo, es el que presentan las especies que ponen una sola vez en su vida como el salmon coho (*Oncorhynchus kisutch*) o las que hacen una sola puesta al año como el salmón atlántico (*Salmo salar*).
- b) Ovarios con desarrollo sincrónico por grupos, el ovario posee al menos dos grupos de oocitos en distinto estado de desarrollo. Las puestas son un acontecimiento estacional y se puede clasificar en especies de puesta única o puesta múltiple. En especies de puesta única el grupo de oocitos más avanzado se desarrolla de forma simultánea, produciendo una sola puesta al año como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Las especies de puesta múltiple como la lubina, repiten este proceso varias veces durante la época de puesta.
- c) Ovarios con desarrollo asincrónico, el ovario presenta oocitos en todos los estados de desarrollo. Los peces de este grupo, como el pez cebra (*Danio rerio*) o la tilapia (*Oreochromis niloticus*) presentan una época de puesta muy extendida, en la que emiten oocitos en repetidas ocasiones.

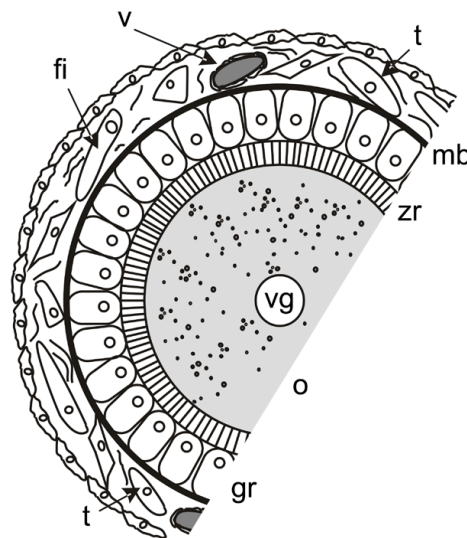


Figura 1.3. Representación esquemática de un folículo ovárico en vitelogénesis temprana. Vasos sanguíneos (v), fibroblastos (fi), células de la teca (t), membrana basal (mb), células de la granulosa (gr), zona radiata (zr), oocito (o), vesícula germinal o núcleo (vg). Adaptado de Nagahama (1983)

Oogénesis

Al igual que sucede con la espermatogénesis, el proceso de oogénesis se inicia con la proliferación mitótica de las oogonias y la diferenciación de éstas en oocitos primarios con el inicio de la primera meiosis. La oogénesis se puede clasificar en cuatro etapas: 1) proliferación mitótica de las oogonias, 2) crecimiento primario, 3) vitelogénesis y 4) maduración. Cada año o al inicio de cada ciclo reproductivo, en función de la estrategia reproductiva de la especie, las oogonias inician una nueva fase de mitosis, generando nuevos oocitos, los cuáles madurarán en la siguiente época de puesta (Zanuy et al., 2009). Con el inicio de la meiosis los oocitos se aíslan y se envuelven con células especializadas provenientes del epitelio, las células de la granulosa. Alrededor de ellas se organizará otra capa de células somáticas derivadas del estroma, las células de la teca. Esta agrupación de células recibe entonces el nombre de folículo (Fig. 1.3). La meiosis se detiene en la profase, cuando el núcleo está en diploteno (profase I), y es cuando se inicia la segunda fase de crecimiento del folículo, que recibe el nombre de folículo previtelogénico. Es durante esta fase de crecimiento cuando se sintetiza en el núcleo una gran cantidad de RNA ribosómico y mensajero, además de acumular glicoproteínas (Wallace y Selman, 1990), fuente de nutrientes que asegurarán un buen proceso de fertilización y de desarrollo embrionario (Zanuy et al., 2009). Todas estas proteínas se acumularán en los alveolos corticales situados en la periferia del oocito y que más tarde, a medida que avanza el desarrollo folicular, se desplazarán hacia el núcleo. Este crecimiento va acompañado por grandes cambios en el núcleo (Le Menn et al., 2007), como es la aparición de nucléolos responsables de la producción de los RNAs anteriormente mencionados. Durante esta fase de crecimiento el oocito ya experimenta una cierta acumulación de lípidos y en las últimas etapas de la previtelogénesis, se observa cómo el corion se deposita en la periferia del oocito, a la vez que aparecen las microvellosidades o conexiones entre el oocito y las células foliculares que servirán de contacto con las células de la granulosa.

La fase de crecimiento secundario del oocito corresponde a la vitelogénesis, recibiendo entonces el nombre de folículo vitelogénico, y se caracteriza por la acumulación de las proteínas del vitelo dentro del oocito (Fig. 1.4). La vitelogenina es una lipofosfoglicoproteína producida por el hígado bajo el estímulo del estradiol (E2), liberada al torrente sanguíneo e internalizada por los oocitos mediante pinocitosis y a través de receptores específicos de vitelogenina (Mañanós et al., 1997). La vitelogenina da lugar a las reservas vitelinas del huevo o vitelo (Carrillo y Zanuy, 1993), y de su correcta síntesis, procesado y acumulación

depende la calidad del mismo y la viabilidad de la larva (Lubenzs et al., 2010; Mylonas et al., 2010).

Todos estos acontecimientos tienen lugar en oocitos detenidos en la profase I de la meiosis (diploteno). Una vez finalizada la vitelogénesis, el oocito postvitelogénico reanuda la meiosis y empieza el proceso de maduración. En esta etapa el núcleo, o vesícula germinal, que ocupa una posición central en el citoplasma, migra hacia el polo animal, donde se disgrega y se produce la extrusión del primer corpúsculo polar. Este momento marca el fin de la primera meiosis y el inicio de la segunda meiosis, que volverá a detenerse en metafase II y ya no se completará hasta el momento de la fertilización. Durante la maduración se observan además cambios en el citoplasma del oocito, como fusión de gránulos de vitelo, clarificación del citoplasma, y en especies marinas, el aumento del tamaño debido a la hidratación (Cerdá, 2009). Una vez producida la hidratación tiene lugar la ovulación, momento en el cual la pared del folículo se rompe y el oocito es liberado al oviducto.

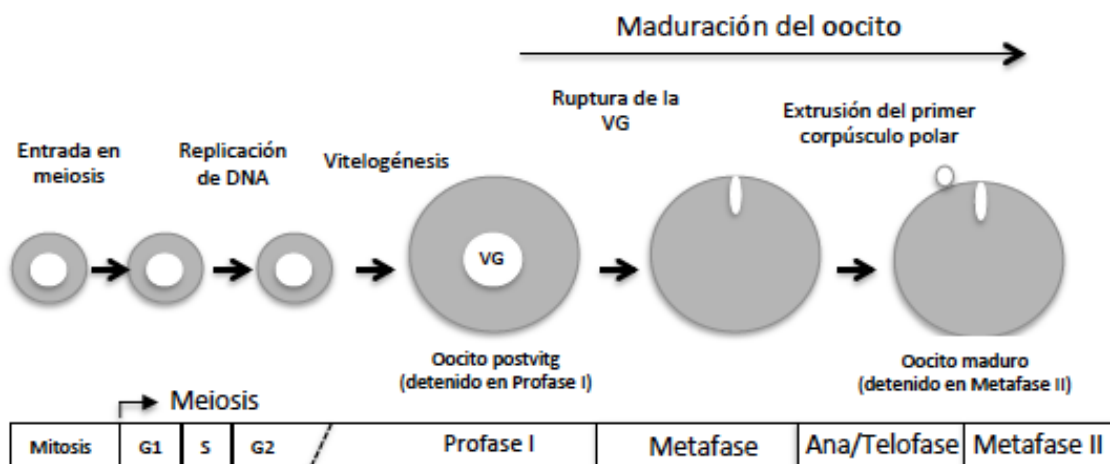


Figura 1.4. Representación del crecimiento y maduración del oocito en teleósteos. Desde oocito primario, oocito vitelogénico, hasta oocito maduro. Adaptado de Suwa y Yamashita (2007).

1.3. Control endocrino de la reproducción en teleósteos.

Uno de los principales desafíos a los que ha de enfrentarse todo ser vivo es el reto reproductivo, y para optimizar el proceso reproductor, en muchas especies, éste está sometido a un riguroso control hormonal y ambiental. El control hormonal de la reproducción está

organizado a tres niveles definidos por los tres órganos que constituyen el eje cerebro-hipófisis-gónada (eje CHG), siendo el cerebro quien dirige y coordina a los restantes. En el cerebro se integran los estímulos externos e internos, y se sincroniza el inicio de la recrudescencia gonadal con los factores ambientales, de manera que la puesta suceda en condiciones óptimas para la progenie; también se sincroniza a los reproductores, consiguiendo una maduración simultánea (Muñoz-Cueto, 2009). En los peces la glándula pineal es el principal componente del sistema nervioso responsable de recibir cambios en el fotoperiodo (luz). El órgano pineal transduce estas señales ambientales en hormonales (melatonina) y neuronales (neurotransmisores) (Reiter, 1993; Falcón et al., 2007), las cuales, de alguna manera, son captadas por el hipotálamo y la hipófisis, encargados de sintetizar los factores directamente relacionados con la reproducción, como el factor liberador de las gonadotrofinas (GnRH) en el caso del hipotálamo y las gonadotrofinas (GtHs) Fsh (hormona estimuladora del folículo) y Lh (hormona luteinizante) en el caso de la hipófisis.

1.3.1. Cerebro

El hipotálamo es una de las partes del cerebro responsable de controlar la síntesis y liberación de hormonas hipofisiarias mediante la producción de neurohormonas tales como la GnRH, la dopamina, las kisspeptinas, el neuropéptido Y (NPY), el ácido γ amino butírico (GABA) y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) entre otros (revisado en Muñoz-Cueto, 2009). Todos estos factores tienen como objetivo llegar a la hipófisis. En mamíferos, el sistema portal hipofisiario se definió por primera vez en 1930 por Popa y Fielding, quienes describieron la presencia de venas comunicantes entre la glándula hipofisiaria y el hipotálamo. En el caso de teleósteos la ausencia de un contacto vascular entre ambas partes del cerebro determina que la comunicación se haga mediante fibras nerviosas que penetran a través del tallo hipofisario y transportan las neurohormonas previamente citadas hasta la hipófisis, modulando su actividad.

En la lubina, como en la mayoría de teleósteos, existen 3 GnRHs distintas (GnRH1, GnRH2 y GnRH3) que están codificadas por tres genes distintos y tienen distinta distribución cerebral, de hecho en esta especie el sistema de las GnRH está muy bien caracterizado (González-Martínez et al., 2002; Zmora et al., 2002). La GnRH1 se expresa principalmente en el hipotálamo y el área preóptica, la GnRH2 se expresa en el sinencéfalo/mesencéfalo, y la GnRH3 se ha identificado en el cerebro anterior (revisado en Muñoz-Cueto, 2009)

En muchas especies de peces se ha detectado que la GnRH incrementa la expresión hipofisiaria de los mRNA codificantes de las gonadotrofinas (revisado en Yaron et al., 2003). Sin embargo, no todas las GnRH ejercen esa acción con la misma potencia, habiendo variaciones entre unas formas y otras; ya que es la GnRH1 la que presenta la función hipofisiotrófica (Kah et al., 2007). Las GnRHs ejercen su acción uniéndose a receptores específicos, que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Sealfon et al., 1997). La expresión de estos receptores no se limita a la hipófisis, pues se han encontrado en otros órganos como las gónadas, lo que refuerza la teoría de que las GnRH también podrían ejercer una acción autocrina o paracrina en ellas (revisado en Muñoz-Cueto, 2009).

Recientemente el sistema cerebral KiSS/GPR54 ha revolucionado la percepción tradicional del eje cerebro-hipófisis-gónada, ya que se ha convertido en un elemento esencial dentro de éste como activador de la secreción de gonadotrofinas, siendo posiblemente el mediador de la respuesta del eje CHG ante los estímulos ambientales, la retro-alimentación de los esteroides gonadales y los factores metabólicos (Tena-Sempere, 2006). En muchos peces teleósteos, entre los que se encuentra la lubina, y en otros vertebrados este sistema está duplicado pues existen dos genes codificantes de kisspeptinas, *kiss1* y *kiss2*, así como dos genes para los receptores, *gpr54-1b* y *gpr54-2b* (Tena-Sempere et al., 2012). Además, y contrariamente a lo descrito en mamíferos donde el sistema KiSS/GPR54 regula la función de las neuronas GnRH, en lubina, se ha demostrado recientemente que las neuronas GnRH no expresan ninguno de los genes *kiss* (Escobar et al., 2013). Esto coincide con lo previamente descrito en pez cebra (Servili et al., 2011) y medaka (*Oryzias latipes*) (Kanda et al., 2013). No obstante, en vertebrados este sistema también se expresa en otros órganos como hipófisis, placenta, gónadas, páncreas, pero todavía se necesita estudiar qué funciones específicas realizan en estos tejidos.

1.3.2. Hipófisis

La hipófisis es una pequeña glándula que en los peces, al igual que en el resto de vertebrados, se localiza en la parte ventral del cerebro, alojada en lo que se conoce como silla turca (Van Oordt y Peute, 1983). Se encuentra justo debajo del hipotálamo, conectada con él por un pequeño tallo (Frisen, 1967) constituido por fibras neurosecretoras. Esta glándula está organizada en dos partes, la neurohipófisis, que deriva del diencefalo ventral y que constituye el compartimento neuronal, y la adenohipófisis, formada por células secretoras no nerviosas

(Levavi-Sivan et al., 2010). La adenohipófisis de los teleósteos se diferencia en dos partes; *Pars intermedia* y *Pars distalis*, esta última a su vez se divide en dos partes, *Rostral pars distalis* y *proximal pars distalis*. Las células gonadotropas productoras de GtHs están localizadas en la *proximal pars distalis*. A diferencia de los mamíferos, donde las mismas células gonadotropas producen FSH y LH (Liu et al., 1988), en lubina, no se ha detectado co-localización celular de estas hormonas (Molés et al., 2011a), lo cual implica que como sucede en otras especies de peces (Weltzein et al., 2004; Levavi-Sivan et al., 2010) las dos GtHs están producidas por células distintas, situándose las encargadas de producir Lh en una posición periférica y las productoras de Fsh en una posición más central en la adenohipófisis.

La existencia de factores de origen hipofisario capaces de controlar el estado de maduración gonadal se corroboró por primera vez en mamíferos, tras detectar la regresión de las gónadas en animales hipofisectomizados (Bousfield et al., 1994). En peces, los experimentos realizados por B.A. Houssay (1930) demostraron también la existencia de esos factores hipofisarios y su efecto en la maduración de la gónada. A partir de estos estudios se desarrollaron los primeros ensayos hormonales de inducción a la puesta mediante inyección de un homogeneizado de pituitarias (En Pickford y Atz, 1957).

Las primeras investigaciones sobre las GtHs de peces realizadas a principios de la década de los 80 solo reconocían la existencia de una única gonadotrofina (Burzawa-Gerard, 1982), ya que con las técnicas de cromatografía de intercambio iónico, disponibles en ese momento, se logró aislar una hormona con función similar a la LH en la carpa común (*Cyprinus carpio*) (Burzawa-Gerard, 1971) y el salmón chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Donaldson et al., 1972). Hacia finales de la década de los 80 se demostró la dualidad de la actividad gonadotropa de extractos de la pituitaria de salmón keta (*Oncorhynchus keta*) (Kawauchi et al., 1986), al tiempo que se purificaron dos gonadotrofinas diferentes (GtH1 y GtH2) en el salmón keta (Suzuki et al., 1988) y en el salmón coho (Swanson, 1991). Los estudios basados en el análisis de las secuencias aminoacídicas permitieron establecer la homología entre la GtH1 y la GtH2 de peces con la FSH y la LH de los tetrápodos, respectivamente (Suzuki et al., 1988). Tras el desarrollo de radioinmunoensayos (RIA) específicos para GtH1 y GtH2 en trucha arcoíris (Prat et al., 1996) se les denominó como Fsh y Lh, respectivamente. Desde entonces se han identificado y caracterizado gonadotrofinas en más de 56 especies de peces (Zanuy et al., 2009; Levavi-Sivan et al., 2010 para una revisión más detallada).

Las gonadotrofinas FSH y LH, al igual que la gonadotrofina coriónica humana (hCG) y la tirotrifina (TSH), forman parte de la familia de hormonas glicoproteicas. Son heterodímeros glicosilados que comparten una subunidad α que está unida de manera no covalente a una subunidad β específica (Pierce y Parsons, 1981), que determina la actividad biológica y la especificidad de la hormona (Boime y Ben-Menahem, 1999). Cada subunidad está codificada por un gen parálogo diferente (procedente de un gen ancestral común), lo que explica las similitudes encontradas en sus secuencias. Entre estas similitudes la más destacada es la presencia de una serie de cisteínas en posiciones conservadas. La unión entre las subunidades α y β ocurre en el retículo endoplásmico; y en ese momento la formación de tres puentes disulfuro intracatenarios entre las cisteínas conservadas es esencial para la dimerización y el plegamiento correcto de estas glicoproteínas (Hearn y Gomme, 2000). Esa unión es imprescindible para que alcancen actividad biológica, ya que solo el heterodímero intacto es capaz de unirse de manera específica a su receptor, siendo las subunidades por sí solas biológicamente inactivas (Pierce y Parsons, 1981). Una vez sintetizadas las dos subunidades y formado el dímero, las GtHs se liberan al torrente sanguíneo que las transporta a su lugar de acción, las gónadas, donde, mediante la unión a receptores específicos, activan distintas señales encargadas de regular su desarrollo. En la unión con el receptor es importante una región concreta de estas glicoproteínas denominada *seat belt*. Esta zona además de proporcionar estabilidad al heterodímero, es una zona de interacción con el receptor (Swanson et al., 2003), al contener elementos específicos de reconocimiento con el mismo (Moyle et al., 1994).

1.3.3. Gónadas

Los receptores de la FSH (FSHR) y de la LH (LHR) pertenecen a la superfamilia de GPCRs. Estos están constituidos por una sola cadena proteica con tres dominios; un dominio extracelular formado por la parte amino-terminal, una región con siete hélices $\square$ transmembranales y un dominio intracelular carboxi-terminal. De todos ellos, el dominio extracelular es el que actúa reconociendo el ligando y generando la especificidad de esa unión (Ascoli et al., 2002). Los receptores de GtHs están localizados en las gónadas, sin embargo en muchas especies de peces estudiadas se ha detectado expresión de *lhr* en tejidos extragonadales como riñón cefálico, hígado, corazón, branquias (revisado en Zanuy et al., 2009) sin tener claro todavía cuál sería su función o si se llega a sintetizar la proteína. Los primeros trabajos en mamíferos delimitaron la expresión de ambos receptores en las células somáticas que constituyen las gónadas. En machos el *LHR* se expresa en las células de Leydig

y el *FSHR* en las células de Sertoli (Wahlström et al., 2010), de lo que se deduce la función de cada gonadotrofina, la LH regula la producción de esteroides, mientras que la FSH se encarga de la proliferación y el funcionamiento de las células de Sertoli en el testículo inmaduro (McLachlan et al., 2002). En hembras en estado inmaduro el *LHR* se encuentra en las células de la teca y el *FSHR* en la granulosa, apareciendo expresión de *LHR* en ambas, granulosa y teca, en folículos de mayor tamaño (Camp et al., 1991). En peces, los primeros trabajos realizados en salmón coho (Miwa et al., 1994; Yan et al., 1992) localizaron al *Lhr* en células de la granulosa en hembras y en las células de Leydig en machos, encontrando *Fshr* en células de la teca y de la granulosa en hembras y en las células somáticas que rodeaban espermatocistes en desarrollo en machos. Trabajos más recientes han proporcionado una localización más precisa en anguila japonesa (*Anguilla japonica*) (Ohta et al., 2007), pez gato Africano (*Clarias gariepinus*) (García-López et al., 2008), pez cebra (García-López et al., 2010) y en lenguado (*Solea senegalensis*) (Chauvigné et al., 2012), demostrando que las células de Leydig también expresan el *fshr*. Los perfiles de expresión de los receptores de las GtHs van cambiando a lo largo del ciclo reproductivo posiblemente como respuesta a los cambios de los niveles circulantes de gonadotrofinas y esteroides. En el siguiente apartado se hace una descripción más detallada de los perfiles de expresión de los receptores a lo largo del ciclo reproductivo, así como de la acción específica de cada gonadotrofina.

En mamíferos la especificidad ligando-receptor es clara ya que la FSH y la LH interactúan con sus respectivos receptores de manera muy específica (Braun et al., 1991; Moyle et al., 1994). Sin embargo, es importante destacar que en peces el *Fshr* muestra una conducta más promiscua y a pesar de tener preferencia por la Fsh es capaz de activarse también por la Lh, como se ha observado en estudios realizados *in vitro* con hormonas homólogas y los receptores de salmón coho (Miwa et al., 1994; Yan et al., 1992), pez gato Africano (Vischer et al., 2003; Bogerd et al., 2001) el pez gato americano (Kumar et al., 2001 a, b), pez cebra (Kwok et al., 2005; So et al., 2005) y lenguado (Chauvigné et al., 2012). Sin embargo, la activación del *Fshr* por parte de la Lh requiere dosis muy elevadas, lo cual sólo sucede *in vivo* en periodos puntuales cuando los niveles plasmáticos de Lh alcanzan su mayor nivel (Schulz et al., 2010). En otra especie de salmónido, el salmón amago (*Oncorhynchus masou ishikawae*) (Oba et al., 1999a, b), el *Fshr* sólo responde a la Fsh, presentando el *Lhr* cierta respuesta a la Fsh. En el caso de lubina, cada GtH activa exclusivamente a su propio receptor (Molés et al., 2011b), lo mismo que sucede en la trucha arcoiris (Sambroni et al.,

2007). Es probable que en teleósteos el patrón de respuesta del Fshr dependa de la especie o taxón, siendo el Lhr específico para su ligando (Levavi-Sivan et al., 2010).

Las gónadas, además de ser el lugar de producción de los gametos, se caracterizan por ser un órgano endocrino potente e importante encargado de la síntesis de los esteroides sexuales bajo la estimulación de las GtHs. La acción combinada de los esteroides sexuales y de las GtHs, Fsh y Lh, regula finalmente el desarrollo gonadal (Borg, 1994; Patiño et al., 2001). El proceso de esteroidogénesis, es decir, la síntesis de esteroides, no es exclusivo de la gónada, y en peces existen otros órganos con esta capacidad, como el riñón cefálico y el cerebro, teniendo éste último un papel importante en la diferenciación sexual (para más información ver Piferrer, 2009). La síntesis de todos los esteroides parte de un precursor común, el colesterol y la llegada de éste al lugar donde se producirá su primera conversión enzimática es la etapa más crítica del proceso y está controlada hormonalmente (Stocco, 2000). A partir de esta molécula básica se generan los distintos tipos de esteroides: andrógenos, estrógenos, progestágenos, glucocorticoides y mineralocorticoides. El colesterol se localiza en el exterior de la membrana mitocondrial, en gotas lipídicas o en las membranas plasmáticas de las células esteroidogénicas, y es transportado al interior de la membrana mitocondrial, donde tiene lugar la primera conversión, mediante la acción de la enzima P450_{scc} (citocromo P450 de escisión de la cadena lateral de colesterol) que lo transforma en pregnenolona (Fig. 1.5). El transporte del colesterol es un proceso asistido por una fosfoproteína de 30kDa asociada a la mitocondria (Stocco, 2000) y denominada proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR, *steroidogenic acute regulatory protein*). El mecanismo empleado por la StAR para transportar colesterol al interior de la membrana mitocondrial todavía se desconoce, pero al parecer la proteína StAR interactúa de manera directa con la membrana, sin ayuda de intermediarios (Kallen et al., 1998a, b) pero valiéndose del receptor de benzodiacepina (Papadopoulos, 1993; Hauet et al., 2005).

La pregnenolona, 17 α -hidroxipregnenolona o la dehidroepiandrosterona sirven como precursores para la síntesis del resto de hormonas esteroideas. Éstas se transforman por acción de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/isomerasa (3 β -Hsd) en progesterona, 17 α -hidroxiprogesterona y androstenediona. Otras enzimas del complejo citocromo P450 como 17 α -hidroxilasa/17,20-liasa (P450_{c17}/Cyp17a), localizada en el citoplasma, y P450 11 β -hidroxilasa (P450_{11 β} /Cyp11 β), localizada en la mitocondria, también intervienen en la transformación hacia la formación de testosterona (T) y 11-cetotestosterona (11KT).

Finalmente la acción de la aromatasa transforma la T y la androstenediona en estradiol (E2) y estrona (E1), respectivamente.

En machos, las células de Leydig están especializadas en sintetizar los esteroides sexuales, y en mamíferos se ha descrito que lo hacen bajo el estímulo de la LH (Benton et al., 1995; Sriraman et al., 2003); mientras que la FSH actúa de manera indirecta a través de las células de Sertoli (Lejeune et al., 1998). En peces, las células de Leydig también sintetizan estos esteroides, probablemente bajo el efecto de la Lh dado que por el momento el Lhr sólo se ha localizado de forma clara en este tipo celular. Existen trabajos en lubina (Molés et al., 2008, 2011b), salmón coho (Luckenbach et al., 2011), anguila japonesa (Ohta et al., 2007; Kazeto et al., 2008), lenguado (Chauvigné et al., 2012), pez cebra (García-López et al., 2010) y trucha arcoíris (Sambroni et al., 2013) que confirman la actividad esteroideogénica de la Fsh. Sin embargo no estaba claro si esa acción era directa, mediante la presencia de receptores Fshr en las células de Leydig, o indirecta a partir de su acción sobre las células de Sertoli. Dado que ya se ha demostrado la existencia del Fshr en las células de Leydig de algunas especies de peces, tales como anguila japonesa (Ohta et al., 2007), pez gato africano (García-López et al., 2008), pez cebra (García-López et al., 2010) y lenguado (Chauvigné et al., 2012), es bastante probable que la actividad esteroideogénica de la Fsh venga dada por la presencia de su receptor en este tipo celular, algo que, sin embargo, queda pendiente de corroborar en la lubina.

En el caso del ovario la situación es bastante diferente, ya que la producción de esteroides no la realiza un único tipo celular, si no que tanto las células de la granulosa como las de la teca participan de manera activa en el proceso. Esta colaboración entre los dos tipos celulares fue definida por Nagahama (1994) como el modelo de las dos células (*two-cell type model*). En este modelo, las células de la teca son responsables de sintetizar andrógenos (principalmente T) y las de la granulosa se encargan de realizar su conversión a estrógenos (principalmente E2).

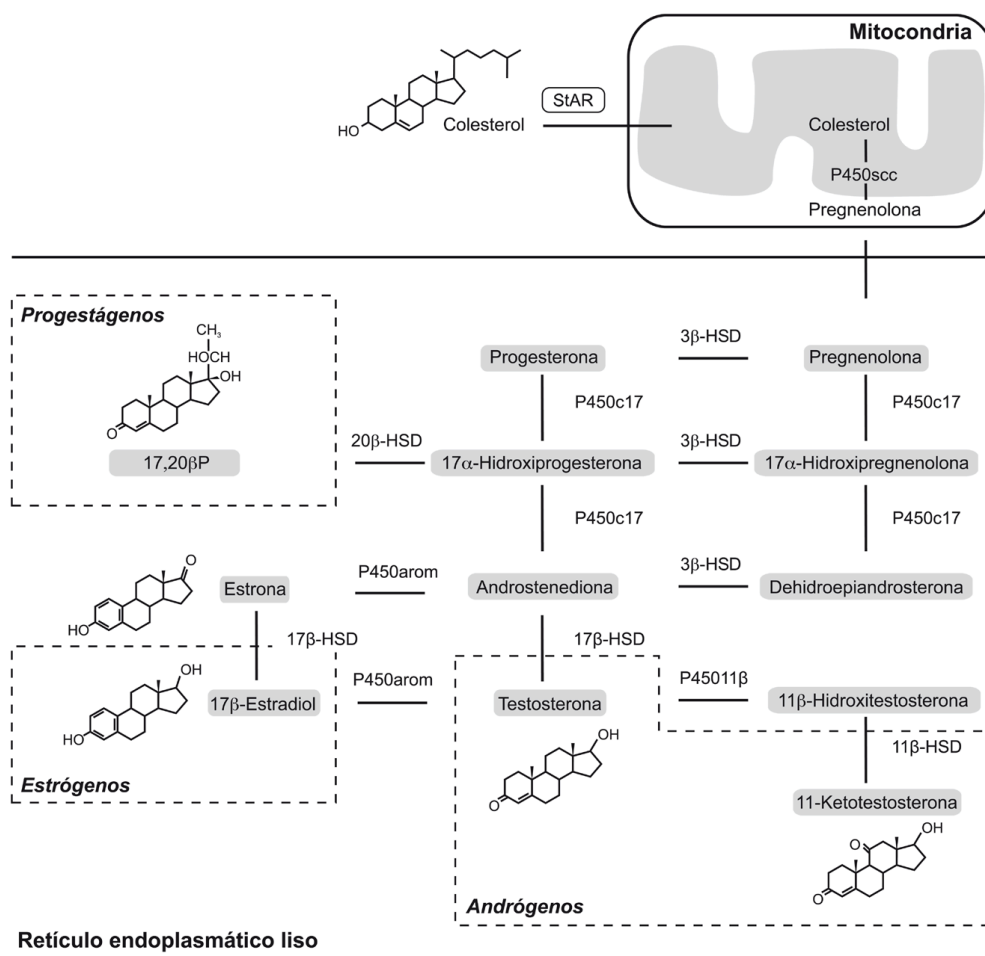


Figura 1.5. Ruta de la biosíntesis de los esteroides gonadales en los peces teleósteos. Proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR); enzima P450 de la escisión de la cadena lateral de colesterol (P450scc); 17α-hidroxilasa/17,20-liasa (P450c17); 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/Δ5-Δ4-isomerasa (3β-HSD); 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11β-HSD); 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD); 20β- hidroxiesteroide deshidrogenasa (20β-HSD); P450 aromatasa (P450arom); P450 11β-hidroxilasa (P45011β); 17α,20β-hidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20βP). Las áreas con líneas discontinuas delimitan los esteroides predominantes en el plasma de los teleósteos. Tomado de Molés (2011).

1.4. Función de las gonadotrofinas en la gametogénesis

Las GtHs son los principales reguladores de la función gonadal de los peces, por lo que es muy importante conocer cómo fluctúan sus niveles, tanto en la hipófisis como en el plasma, ya que esto permite ampliar el conocimiento acerca de la fisiología reproductiva. La información obtenida hasta el momento indica que la Fsh y la Lh se liberan en distintos momentos del ciclo reproductivo, variando entre machos y hembras, lo que concuerda con una función diferencial. No obstante, debido a la escasez de herramientas para medir los niveles en plasma de ambas GtHs, sobre todo de Fsh, la información disponible se limita a

unas pocas especies de salmones (Swanson, 1991), trucha arcoíris (Gómez et al., 1999), tilapia (Aizen et al., 2007), y recientemente lubina (Molés et al., 2012). La necesidad de purificar las GtHs a partir de hipófisis dificulta mucho el desarrollo de inmunoensayos para Fsh y Lh, debido a la gran cantidad de material de partida que se necesita para ello. Con el desarrollo de las técnicas de biología molecular se han podido aislar los genes codificantes de las subunidades de las GtHs en un gran número de especies (revisado en Zanuy et al., 2009), permitiendo la producción de GtHs recombinantes (Levavi-Sivan et al., 2010), lo que facilita y hace más accesible el desarrollo de estos ensayos. Una alternativa a los inmunoensayos ha sido la evaluación de los niveles de expresión génica de las subunidades de las GtHs en hipófisis, aunque ésta no necesariamente ha de estar correlacionada con los niveles plasmáticos de las correspondientes hormonas (Levavi-Sivan et al., 2010).

Los primeros datos sobre niveles circulantes de Fsh y Lh se obtuvieron en salmón coho (Swanson, 1991) y en trucha (Prat et al., 1996; Gómez et al., 1999). En estas especies, los niveles plasmáticos de Fsh incrementan durante el inicio de la oogénesis (coincidiendo con el inicio de la vitelogénesis) y de la espermatogénesis (revisado en Swanson et al., 2003). En el caso de la trucha la concentración sanguínea de Fsh baja durante el crecimiento secundario para volver a incrementar en el momento en que se inicia el reclutamiento de los oocitos para el siguiente ciclo reproductor. Sin embargo, en salmón coho, al tratarse de una especie de puesta única, los niveles de Fsh permanecen elevados hasta el inicio de la ovulación y espermiación, momento en el que disminuyen (Swanson, 1991). Gómez y colaboradores (1999) evaluaron, en trucha arcoíris, los niveles de expresión de *fsh β* en hipófisis, y encontraron un perfil similar al de la proteína en plasma. En otras especies como tilapia (Melamed et al., 1997), lubina americana (*Morone saxatilis*) (Hassin et al., 1998), falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*) (Kajimura et al., 2001), y pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) (Kumar y Trant, 2004) se ha observado que los niveles de expresión de *fsh β* incrementan durante el inicio del crecimiento de la gónada (vitelogénesis en las hembras), para luego disminuir en el período de puesta. De manera opuesta, los niveles plasmáticos de Lh permanecen muy bajos, casi indetectables, durante las fases tempranas de la gametogénesis, para luego incrementar durante la maduración final de los oocitos y la espermiación (referencias en Swanson et al., 2003). Los datos obtenidos hasta el momento en ejemplares adultos de lubina muestran que no existe coincidencia entre los niveles de expresión, el contenido de GtHs en hipófisis y sus niveles en plasma, posiblemente debido a

que los mecanismos de síntesis y liberación están sometidos a distintos procesos de regulación (Mateos et al., 2002; Rocha et al., 2009; Molés et al., 2012).

En el caso de peces no salmónidos, como especies de puestas múltiples o con desarrollo gonadal asincrónico, no se ha observado esta diferencia temporal en la expresión de *fsh β* y *lh β* . En estas especies se ha visto que la expresión de *fsh β* y *lh β* tienen un perfil paralelo durante todo el ciclo reproductivo, incrementando en el momento de la puesta. Esto sucede en dorada (*Sparus aurata*) (Meiri et al., 2004), en lubina (Mateos et al., 2003), en dorada japonesa (*Pagrus major*) (Gen et al., 2000), gourami azul (*Trichogaster trichopterus*) (Jackson et al., 1999) y carpín dorado (*Carassius auratus*) (Sohn et al., 1999).

La presencia de receptores para las GtHs es decisiva para que éstas ejerzan su función. Los estudios realizados en diferentes especies de teleósteos muestran diferencias en el patrón de expresión gonadal de los genes *fshr* y *lhr*, lo cual sugiere su implicación en períodos críticos de la gametogénesis. En algunas especies de puestas sincrónicas por grupos, como el pez gato americano, se ha visto, que durante el crecimiento primario del oocito ambos receptores se expresan poco, aumentando la expresión del *fshr* en la previtelogénesis y del *lhr* en post-vitelogénesis (Kumar et al., 2001a,b). Estos perfiles coinciden con los patrones de expresión de las subunidades β de las GtHs. Sin embargo, en algunas especies de salmónidos (Campbell et al., 2006; Bobe et al., 2004) los niveles del *fshr* permanecen inalterados hasta el momento de la maduración del oocito, que es cuando aumentan, mientras que los niveles de Fsh en plasma y pituitaria presentan unos perfiles elevados en las fases previas. En el caso de la lubina la expresión ovárica tanto del *fshr* como del *lhr* muestran un perfil similar (Rocha et al., 2009), con un incremento mayor de *fshr* durante la vitelogénesis, permaneciendo ambos elevados durante la fase de maduración-ovulación. Los máximos niveles de Fsh en plasma se detectan durante las fases de vitelogénesis y post-vitelogénesis, descendiendo en las de maduración y ovulación (Molés et al., 2011a y 2012). En ese momento los niveles plasmáticos de Lh alcanzan su nivel máximo (Rocha et al., 2009).

En el caso de los testículos, la información disponible acerca de la evolución de la expresión de los receptores de GtHs es escasa. En muchas de las especies estudiadas la expresión del *fshr* fluctúa al inicio del ciclo reproductivo, incrementando durante la espermiación (revisado en Levavi-Sivan et al., 2010). Por su parte el *lhr* muestra mayor expresión durante la fase de espermiación, lo cual suele coincidir con la elevación de la Lh en plasma como sucede en la trucha arcoíris (Kusakabe et al., 2006). En el caso de la lubina (Rocha et al., 2009) ambos

receptores presentan una expresión en paralelo con un perfil bimodal, alcanzando los mayores niveles durante la espermiación. Esa mayor expresión del *lhr* durante la fase de espermiación coincide con los niveles plasmáticos de Lh más elevados, sin embargo los niveles de Fsh se incrementan durante el desarrollo testicular y decaen justo en el momento que empieza la espermiogénesis (Molés et al., 2012).

1.4.1. Acción de los esteroides sexuales durante la espermatogénesis

Como ya se mencionó en el apartado 1.2.2 las mitosis que experimentan las SSC pueden dirigirse hacia su propia renovación, o bien hacia su diferenciación en espermatozoides mediante meiosis. En algunas especies se ha descrito que el proceso de renovación de las SSC podría ser consecuencia de la acción del E2 (Fig. 1.6). En dos especies de teleósteos, anguila japonesa y hucho japonés (*Hucho perryi*), se ha demostrado, tanto *in vivo* (Miura et al., 1999; Amer et al., 2001) como *in vitro* (Miura et al., 1999), que la presencia de E2 incrementa las mitosis de las SSC hacia su propia renovación pero no hacia su diferenciación. El efecto proliferativo del E2 está bien documentado en otras especies de vertebrados como las ratas (Li et al., 1997) y los humanos (Pentikäinen et al., 2000), donde se ha detectado que el E2 promueve la expresión de factores de crecimiento celular como el factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (Li et al., 1997), cuyo homólogo en anguila japonesa, eSRS34, fue aislado por Miura et al (2002b). Otros factores reguladores de la proliferación celular son los fibrinógenos (Staton et al., 2003), de los que hay dos identificados en dorada (*FgB* y *FgG*) y cuya expresión aumenta en presencia de E2 (Pinto et al., 2006). En mamíferos se ha descrito que la aparición de mitosis encaminadas hacia la diferenciación de las SSC se genera tras el estímulo de las GtHs. Este cambio es muy importante y debe haber un buen balance entre la renovación y la diferenciación, ya que si hay problemas y las mitosis se dirigen únicamente a renovación de las SSC pueden aparecer seminomas. Si por el contrario se dirigen hacia la diferenciación, las SSC se agotarán y la espermatogénesis se parará (De Rooij y Grootegeed, 1998).

En muchas de las especies de peces estudiadas se ha detectado que los picos de expresión de *fshβ* y *fshr* aparecen en las fases iniciales de la espermatogénesis (principalmente en salmónidos), siendo mayor la expresión de *lhβ* y *lhr* hacia la espermiación. De todo ello se deduce que la Fsh juega su papel principal en los inicios de la espermatogénesis, siendo la Lh relevante en las fases finales (revisado en Levavi-Sivan et al., 2010 y en Zanuy et al., 2009). En mamíferos se ha demostrado que la acción principal de la FSH es promover la

proliferación de las células de Sertoli durante el periodo perinatal y en consecuencia la de las células germinales asociadas a ellas (Abel et al., 2000). También previene la apoptosis de las espermatogonias (Ruwanpura et al., 2008a, b) y es esencial para completar las divisiones mitóticas de las mismas (Yazawa et al., 2000). En peces, se ha demostrado, mediante estudios *in vitro*, que la acción principal de la Fsh es promover la proliferación de las espermatogonias hacia la diferenciación y la formación de esperma (Ohta et al., 2007; Kazeto et al., 2008) a través de su acción sobre las células de Leydig y Sertoli, que como ya se ha explicado anteriormente, son las que expresan el *fshr*. La acción de la Fsh sobre las células de Leydig estimula la producción de 11KT (Ohta et al., 2007; Molés et al., 2008; García-López et al., 2008). Este andrógeno está considerado como el andrógeno más importante en los peces y su función en la espermatogénesis es esencial tal y como se ha demostrado en la anguila japonesa (Miura et al., 1991a y b; Miura et al., 1996) y en el pez cebra (Leal et al., 2009).

La siguiente fase del proceso de espermatogénesis, la entrada en meiosis (Fig. 1.6) de las espermatogonias B para dar lugar a los espermatocitos primarios, también está bajo control hormonal, en esta ocasión no de los andrógenos, sino de los progestágenos. En general, los niveles plasmáticos de 17α , 20β dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP) son altos en la fase final de la espermatogénesis, durante la espermiación, ya que la DHP está considerada como una hormona inductora de la maduración (MIH) en los machos. Sin embargo, en varias especies de teleósteos se han detectado picos en los niveles plasmáticos de DHP en momentos relevantes de la proliferación espermatogonial (Schulz et al., 2010). Mediante tratamientos *in vitro* se ha confirmado que la DHP induce a las espermatogonias a iniciar la meiosis (Miura et al. 2006). Además, la DHP también induce la síntesis de 11KT, esencial para el avance de la espermatogénesis (Ozaki et al., 2006), mediante el incremento de la expresión del gen de la enzima 11- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (*11- β hsd*). Algunos trabajos han demostrado que la hCG (Jiang et al., 2003) y la Lh (Gómez et al., 1999) estimulan la expresión de *11- β hsd*, lo cual concuerda con la implicación de la Lh en las etapas finales de maduración de los gametos. La función principal de la Lh es estimular la síntesis de esteroides implicados en la capacitación y maduración del esperma, como son la DHP anteriormente mencionada y la 17α , 20β -21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona (20β -S) que también actúa como sustancia inductora de la maduración (MIS). Algunos estudios sugieren la posibilidad de que los espermatozoides expresen receptores para DHP y/o 20β -S (Thomas et al., 1997; Miura y Miura, 2003), de manera que los progestágenos estarían implicados en el incremento del pH del plasma

seminal y en el aumento de los niveles de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) en el espermatozoide, responsable de que éste adquiera motilidad (Miura y Miura, 2003).

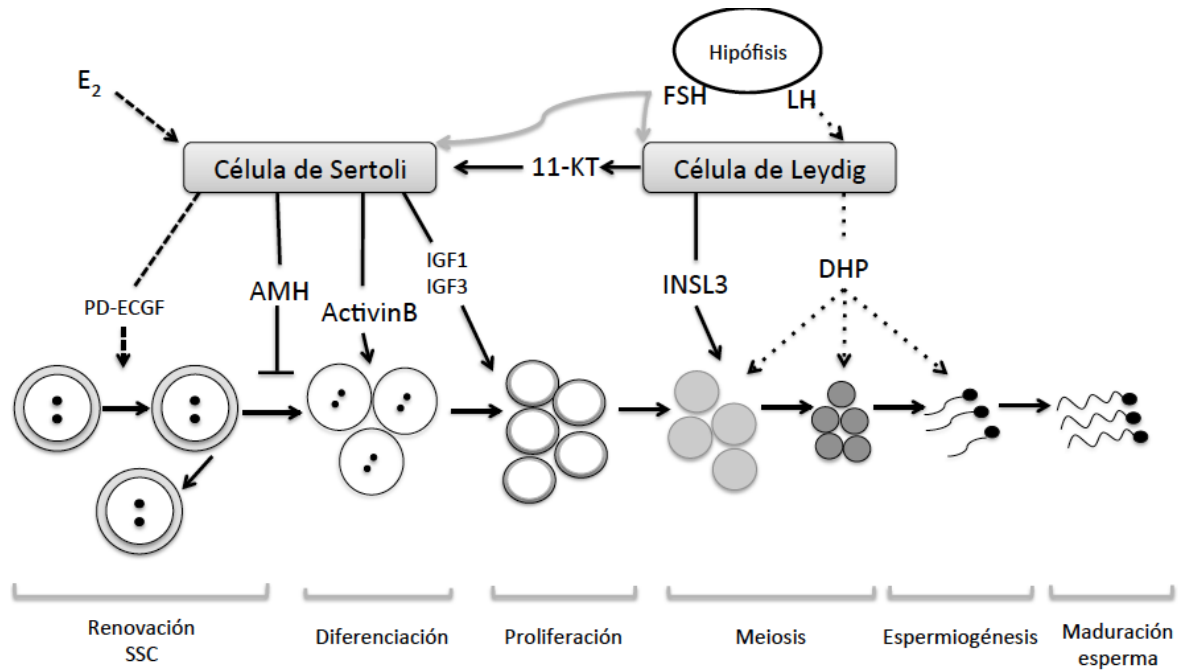


Figura 1.6. Representación esquemática del proceso regulador de la espermatogénesis en peces teleósteos. Espermatogonia indiferenciada de la línea germinal (SSC), factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF), hormona anti-Mülleriana (AMH), factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 y 3 (IGF1, IGF3), relaxina similar a insulina 3 (INSL3), 17,20β-dihidroxi-4pregnen-3ona (DHP). Adaptado de Miura y Miura (2003) y Schulz et al., 2010.

1.4.2. Acción de los esteroides sexuales durante la ovogénesis

La información sobre el control endocrino de las primeras etapas de la ovogénesis es bastante escasa. Al igual que sucede en machos, el E_2 estaría implicado en la regulación de la proliferación de las oogonias, al inducir sus mitosis, mientras que la DHP se encarga de iniciar el proceso de meiosis (Miura et al., 2006). Además se ha descrito que la 11KT podría estar implicada en la deposición de lípidos en el oocito durante el crecimiento primario (Lokman et al., 2007). Existen otros factores no esteroideos implicados en el crecimiento y diferenciación folicular como es el *GDF9*, que en mamíferos es esencial en el desarrollo temprano del folículo (Shimasaki et al., 2004). En el pez cebra (Liu y Ge, 2007) y en la lubina

(Halm et al., 2008) se ha aislado y caracterizado el cDNA de *gdf9*, y se ha visto que su expresión predomina durante el crecimiento primario del oocito.

Uno de los principales protagonistas del proceso de vitelogénesis es el E2, que es responsable de estimular la producción de vitelogenina por parte del hígado para formar las reservas del huevo. La síntesis de E2 es consecuencia directa de la acción de las GtHs (Nagahama, 1994; Devlin y Nagahama, 2002), pero la regulación que ejercen la Fsh y la Lh en este proceso puede variar dependiendo de la especie. En algunos salmónidos la acción de la Fsh predomina sobre la de la Lh (Tyler et al., 1991; Patiño y Sullivan, 2002). En otras especies, como la lubina y la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*), la Lh también estimula la producción de E2 *in vitro* (Molés et al., 2011b; Planas et al., 1997). Se han descrito casos, como el de la dorada japonesa, donde la Lh es más importante que la Fsh en la regulación de la producción de E2 (Kagawa et al., 1998 y 2003; Gen et al., 2000).

La entrada en la fase de maduración viene marcada por la acción de la Lh, cuya función principal es la de inducir la producción de MIH, que en muchas especies se identifica con la progestina DHP (Nagahama, 1997). En otras especies se ha descrito otra progestina como MIH, la 20 β S (Thomas, 1994), e incluso otros esteroides podrían actuar como MIS natural en algunas especies (Kime, 1993). En el caso de las hembras de lubina, tanto la DHP como la 20 β S actúan como MIH de una manera consecutiva (Asturiano et al., 2002).

Como se ha mencionado anteriormente, el E2 se produce durante toda la vitelogénesis (crecimiento del oocito), mientras que la DHP se produce durante la fase de maduración. En trucha común (*Salmo trutta*) (Monserrat et al., 2004) se ha visto que la Fsh es capaz de incrementar la expresión de *cyp19a1a*, el gen codificante de la enzima responsable de la síntesis de estradiol. Durante las etapas iniciales del crecimiento de los oocitos los niveles de expresión de *cyp19a1a*, son altos, disminuyendo al finalizar la vitelogénesis (Bobe et al., 2004) y dando lugar a una reducción en la producción de E2. Algo parecido se observa en el perfil de expresión anual de *cyp19a1a* en ovarios de lubina (Rocha et al., 2009), que presenta un pico máximo durante la vitelogénesis tardía, coincidente con los máximos niveles de E2 en plasma.

Durante la fase de maduración del oocito, la acción de la Lh hace que incremente la expresión del gen de la 20 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (20 β -*hsd*), en detrimento de *cyp19a1a* (Monserrat et al., 2004; Nakamura et al., 2005), la cual parece ser la clave del inicio del proceso de maduración (Tanaka et al., 2002; Nakamura et al., 2005). La 20 β -HSD convierte

los andrógenos procedentes de las células de la teca en DHP, por lo que durante la maduración del oocito (Fig. 1.7) se produce un cambio en las rutas esteroidogénicas, se inhibe la síntesis de estrógenos y se activa la de progestágenos y la consiguiente producción de MIH (Cerdá, 2009). Durante las fases de maduración-ovulación de la lubina se ha detectado un incremento importante en la expresión de *star* (Rocha et al., 2009), que coincide con el cambio en la síntesis de estrógenos a MIH, posiblemente como consecuencia de la necesidad de un aporte rápido de colesterol para responder a esa demanda. Estas variaciones coinciden a su vez con los máximos niveles de Lh plasmática, lo cual corroboraría la implicación de esta GtH en las etapas finales de maduración de los oocitos. Algunos trabajos demuestran que el gen *20 β -hsd* presenta una expresión constitutiva en el ovario ya que el tratamiento con hCG no afecta a sus niveles de expresión (Wang y Ge, 2002; Bobe et al., 2004). Estos resultados sugieren entonces que el nivel del precursor de DHP (17 α -HP), es la pieza clave para este cambio en la síntesis de esteroides y no la expresión de *20 β -hsd*.

Otra de las vías posibles que utiliza la Lh para ejercer su acción es la regulación de la enzima Cyp17A, de la cual existen dos isoformas en tilapia, la Cyp17a1 y la Cyp17a2 (Zhou et al., 2007b). La primera, Cyp17a1, mediante su doble actividad hidroxilasa y liasa cataliza la conversión de progesterona a androstenediona, que a su vez se transformará en T y finalmente en E2. Aparentemente la acción de la Lh suprime la expresión de *cyp17a1*, incrementando la de *cyp17a2*. Ésta, que carece de actividad liasa, no generará androstenediona, favoreciendo entonces la síntesis de MIH. En tilapia se ha visto que la expresión de *cyp17a1* es alta durante la previtelogénesis y se reduce en la fase de maduración, mientras que la expresión de *cyp17a2* se incrementa durante la maduración del oocito (Zhou et al., 2007); sin embargo, no se sabe si la Lh es capaz de incrementar la expresión de *cyp17a2*. La acción de la MIH se ejerce directamente sobre los oocitos a través de receptores de membrana específicos de progestágenos (mPRs) (Patiño y Thomas, 1990; Nagahama, 1997), cuya expresión se ve incrementada por la acción de la Lh (Nagahama, 1997). La estimulación de los mPRs por parte de la MIH induce la producción del factor promotor de la maduración (MPF) (Nagahama y Yamashita, 2008), quien se encargará de reanudar la meiosis en el oocito, a la que sigue la liberación del primer corpúsculo polar y la ovulación del oocito.

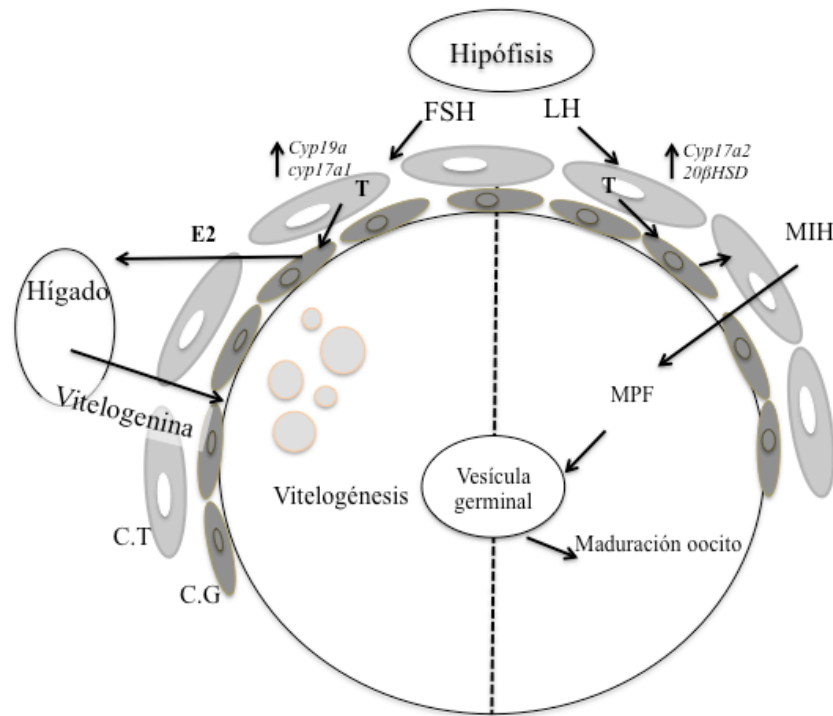


Figura 1.7. Representación esquemática del proceso regulador de la ovogénesis en peces teleosteos. Células de la teca (C.T), células de la granulosa (C.G), hormona inductora de la maduración (MIH), factor promotor de la maduración (MPF), testosterona (T), estradiol (E2), 20β- hidroxisteroide deshidrogenasa (20β-HSD), aromatas (cyp19a1a), 17α- hidroxilasa/17,20- liasa (cyp17a1), 17α- hidroxilasa (cyp17a2). Adaptado de Nagahama et al. (1995 y 2008).

1.5. Control paracrino de la espermatogénesis

En mamíferos la FSH parece ser esencial para el inicio de la espermatogénesis, ya que su presencia es clave para la proliferación de las células de Sertoli durante el periodo perinatal (Allan et al., 2004). Sin embargo, en algunas especies de peces se ha podido completar la espermatogénesis con la sola presencia de 11KT (Miura et al., 1991a, b), ya que las células de Sertoli también expresan receptores de andrógenos (Ikeuchi et al., 2001), de lo que se deduce una acción complementaria de la Fsh y la 11KT. De manera adicional al control endocrino ejercido por estas hormonas, existen factores de crecimiento y mediadores paracrinicos que juegan un papel fundamental en la regulación de la función testicular (Kassab et al., 2007). Existen diversos factores implicados en la proliferación y diferenciación de las espermatogonias, como por ejemplo la activina b (Miura et al., 1995) y los factores de crecimiento similares a insulina de tipo 1 y 2 (Igf1e Igf2, *insulin-like growth factors*) (Loir y Le Gac, 1994; Loir, 1999), que por sí solos son incapaces de generar la maduración completa del testículo, pero que tienen un papel relevante en ella. Recientemente se ha descubierto un

nuevo miembro en la familia de los Igf, el Igf3/Igf1b. Éste se ha descrito en pez cebra, medaka, tilapia y otras especies de teleósteos, y parece ser específico de peces, y además, se expresa exclusivamente en las gónadas (Wang et al., 2008). El Igf3/Igf1b se produce en las células de Sertoli bajo el estímulo de la Fsh y posiblemente, esté implicado en la proliferación y/o diferenciación de las espermatogonias (Sambroni et al., 2013; Morais et al., 2013).

Otros factores de crecimiento que también actúan en las gónadas son los de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF, *epidermal growth factor*). Esta familia está constituida por un extenso número de factores y en peces se han descrito hasta siete ligandos distintos codificados por genes diferentes (Laisney et al., 2010). Estos factores se conocen como, Egf, Tgfa (*transforming growth factor alpha*), Areg (*amphiregulin*), Btc (*betacellulin*), Ereg (*epiregulin*), hbEgf (*heparin-binding EGF-like growth factor*) y Epgn (*epigen*). Estos ligandos se unen y activan al receptor de EGF (Egfr), cuyo gen codificante se encuentra duplicado en peces dando lugar a dos receptores diferentes, Egfra y Egfrb, que son potencialmente capaces de unir a todos los factores mencionados anteriormente. Estos ligandos no se expresan de igual manera en los testículos, por ejemplo en el caso de medaka se ha visto que predominan los transcritos de *btc* y de *tgfa*. Sin embargo, no se dispone de información sobre su participación en el proceso de espermatogénesis, por lo que de momento, esa mayor expresión no se puede asociar a una función relevante. En mamíferos (Garnett et al., 2002; Choi et al., 2005) la acción de las GtHs promueve la expresión del *Egfr* y en hembras de pez cebra se ha observado un incremento en su expresión a lo largo del proceso de maduración del oocito (Wang et al., 2004). Sin embargo, no existe información respecto al perfil de expresión de los *egfr* ni de sus ligandos en testículos de peces durante el proceso de espermatogénesis.

La acción de la Fsh también bloquea la síntesis de factores inhibidores de la espermatogénesis, como la hormona anti-mülleriana (Amh) (Miura et al., 2002b) producida por las células de Sertoli. A pesar de que los peces no tienen conductos müllerianos, en anguila japonesa (Miura et al., 2002b), lubina (Halm et al., 2007), salmón común (Maugars y Schmitz, 2008) y pez cebra (Skaar et al., 2011) se ha clonado un cDNA que codifica un factor de la familia de los Tgfb similar a la AMH de mamíferos, y se ha comprobado que su función es bloquear el inicio de la proliferación de las espermatogonias, de manera que al inhibir su función se promueve el avance de la espermatogénesis (Miura et al., 2002b).

La función principal de las células de Leydig es la de producir esteroides, sin embargo, se ha visto que también son responsables de la producción de factores paracrinicos como la relaxina similar a insulina denominada INSL3. En mamíferos la relaxina se ha descrito como un factor con función anti-apoptótica (Kawamura et al., 2004), y su receptor (LGR8) se ha localizado en células meióticas y postmeióticas (Anand-Ivell et al., 2006). En peces hay poca información sobre la función de este sistema, solo se ha visto que la Fsh, independientemente de los andrógenos, estimula la expresión de *insl3* en pez gato africano (García-López et al., 2008).

1.6. Retroalimentación del eje CHG generada por los esteroides

Los esteroides sintetizados en las gónadas regulan la producción de factores implicados en la reproducción a nivel de cerebro y glándula pituitaria a través de diferentes mecanismos de retroalimentación (*feedback*) positivos o negativos. Los esteroides sexuales se consideran marcadores del estado sexual en el que se encuentra el individuo (Zohar et al., 2010) y por tanto el cerebro actúa en consecuencia, produciendo o bloqueando la síntesis de neuropéptidos y neurotransmisores. Sin embargo, existe una gran disparidad entre los efectos estimuladores o inhibidores de los esteroides sobre el eje CHG, debido fundamentalmente al estado de maduración en que se encuentre el animal, a la especie y al tipo de esteroide. Billard y colaboradores (1976 y 1977) eliminaron la producción de esteroides en trucha mediante gonadectomía, y demostraron que los esteroides ejercen un *feedback* negativo sobre el eje hipotálamo-hipófisis capaz de bloquear la liberación de Lh. En salmón coho (Larsen y Swanson, 1997) también se observó que existía un *feedback* negativo sobre la producción de Lh y Fsh el cual variaba en función del estado de maduración del pez. En otras especies de peces se han obtenido resultados similares tras el tratamiento con esteroides, como en trucha arcoíris (Bommelaer et al., 1981), pez gato africano (de Leew et al., 1986) y carpín dorado (Kobayashi et al., 1990), si bien en estos trabajos el efecto estudiado era sobre la expresión de *fsh β* y no sobre la de *lh β* . La respuesta del cerebro y de la hipófisis también se ve condicionada por el tipo de esteroide, así por ejemplo en el carpín dorado la testosterona y la progesterona disminuyen la síntesis de GABA, determinante para la liberación de gonadotrofinas, a nivel de cerebro e hipófisis, mientras que el estradiol la incrementa (Trudeau, 1997). El mismo *feedback* positivo tiene el estradiol sobre los niveles de GnRH en trucha arcoíris (Breton y Sambroni, 1996) y en anguila europea (*Anguilla anguilla*) (Montero et al., 1995), y sobre los niveles de expresión de *lh β* en anguila europea (Schmitz et al.,

2005); por el contrario la T tiene un efecto negativo sobre la expresión de *fsh* en anguila europea (Schmitz et al., 2005).

En el caso de la lubina, los implantes de T provocan un *feedback* positivo sobre los niveles de GnRH a nivel de hipófisis y de cerebro (Zanuy et al., 1999). También se ha observado un *feedback* positivo de la T y el E2 sobre la expresión de *lh* y sobre los niveles de Lh en la pituitaria. No obstante, ambos esteroides ejercen un *feedback* negativo sobre la expresión de *fsh* (Mateos et al., 2002).

1.7. Rutas de señalización intracelular activadas por las GtHs

Las GtHs ejercen su acción tras la unión a sus receptores específicos, que como ya se ha mencionado anteriormente pertenecen a la familia de GPCR, quienes se encargan de transducir la señal a nivel intracelular para modular distintos procesos. Las GtHs se unen al dominio extracelular de los receptores, donde se encuentra la zona de reconocimiento del ligando (Ulloa-Aguirre et al., 2007). Esta unión se transmite a la zona de transmembrana, aunque los mecanismos responsables de esa transmisión no se conocen (Ulloa-Aguirre et al., 2007). A su vez, los cambios de conformación de la zona de transmembrana generan modificaciones en la zona intracelular y dejan expuestas las zonas de interacción con la proteína G, así como con otras proteínas con las que interactúa el receptor, todas ellas responsables de transmitir la señal. Una vez activada, la proteína G se disocia en dos moléculas, una subunidad α y un heterodímero formado por las subunidades β/γ (Leung et al., 1992; Ulloa-Aguirre et al., 2007). Los receptores de GtHs se acoplan a proteínas G del tipo G_{α_s} , de manera que la subunidad α estimula a la adenilato ciclasa, incrementando la síntesis de AMPc como resultado de la hidrólisis de ATP, y activando a la proteína quinasa A (PKA, *protein kinase A*). Mientras tanto el heterodímero β/γ activa la fosfolipasa C que se encarga de transformar el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato en inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), que a su vez son responsables de la activación de la proteína quinasa C (PKC, *protein kinase C*). Otra posibilidad es que el heterodímero β/γ active la quinasa dependiente de fosfatidil-inositol (Pi3K) (Brock et al., 2002) lo cual deriva en la activación de la proteína quinasa B (PKB/Akt, *protein kinase B*).

1.7.1. GtHs y proteína quinasa A

La ruta más estudiada y conocida entre las que se activan tras la unión de las GtHs a sus receptores es la del AMPc/PKA. El incremento en los niveles de AMPc tras la acción de la

FSH o la LH deriva en la activación de la PKA (Méndez et al., 2005; DeManno et al., 1999). Esta activación genera su translocación hacia el núcleo (DeManno et al., 1999; González-Robayna et al., 2000) para fosforilar factores de transcripción que se unen al DNA en sitios localizados en los promotores de los genes diana, siendo el elemento de respuesta a AMPc (CRE, *cAMP responsive element*) uno de los más conocidos (Salvador et al., 2001; Mukherjee et al., 1996). El control que ejercen las GtHs sobre la esteroidogénesis, a través de la PKA, está regulado por la fosforilación de proteínas que se unen a los sitios CRE localizados en el promotor de genes que codifican enzimas clave en la síntesis de esteroides como la StAR. La PKA es capaz de aumentar la expresión de *StAR* y activar su proteína (Ariyoshi et al., 1998; Manna et al., 2003a; Pescador et al., 1997) mediante dos acciones independientes ejecutadas por las dos subunidades de las que consta esta quinasa. La subunidad I activa la transcripción de *StAR*, mientras que la subunidad II se encarga de fosforilar la enzima para activarla (Dyson et al., 2009).

Estudios en mamíferos (Pescador et al., 1997; Salvador et al., 2001; Poderoso et al., 2008) y en peces (Benninghoff y Thomas, 2006; Garcia-López et al., 2008; Mendez et al., 2003; Paul et al., 2010; Planas et al., 1997) han demostrado que la ruta de la PKA es la principal reguladora del proceso de esteroidogénesis. El uso de análogos del AMPc como la forskolina, el 8Br-cAMP, (Bu)₂cAMP o CTP-cAMP, en experimentos *in vitro* con tejido gonadal, da lugar a un incremento en la producción de esteroides, provocando un aumento en la activación de la PKA. Mientras que en presencia de antagonistas del AMPc como el H89, Rp-cAMPs o KT-5720, esta ruta se bloquea y en consecuencia se provoca una disminución en los niveles de esteroides.

Otros factores de transcripción descritos en mamíferos e implicados en la transducción de la señal activada por las GtHs y mediada por la PKA son la Histona 3 y el factor esteroidogénico-1 (SF1) (Hunzicker-Dunn y Maizels, 2006). El SF1 está implicado en la regulación de genes del complejo citocromo P450 como es el caso de *CYP11A*, *CYP11B*, *CYP17* (Morohashi et al., 1996), *CYP19A* (Parakh et al., 2006) y de genes de otras enzimas implicadas en la esteroidogénesis como la *3β-HSD* (Mason et al., 1997) o la *StAR* (Clark et al., 1995; Stocco, 2000; Gyles et al., 2001).

En mamíferos, la acción de las GtHs mediada por la PKA no suele ser independiente, sino que tiene comunicación con otras rutas como la de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, *mitogen-activated protein kinases*). Las MAPKs están implicadas en

multitud de procesos celulares como proliferación/apoptosis, motilidad y metabolismo. La ruta de las MAPKs consiste en una cascada de tres reacciones de fosforilación y tiene la peculiaridad de que su activación no está directamente acoplada a receptores de membrana (Gerits et al., 2008), sino que depende de otros factores activados por el receptor, como es el caso de la PKA. La interconexión entre la ruta AMPc/PKA y las MAPKs (revisado en Gerits et al., 2008) se conoce desde 1993, pero la implicación de las MAPKs en la regulación de la esteroidogénesis hace poco que se conoce (Gyles et al., 2001; Manna et al., 2007; Otis y Gallo-Payet, 2007). En la mayoría de estos trabajos, la inhibición de las MAPKs por compuestos como PD98059 o U0126 genera una reducción en los niveles de esteroides (Gyles et al., 2001; Manna et al., 2007; Martinelle et al., 2004), y un efecto inhibitorio en la expresión de genes esteroidogénicos como *StAR* (Gyles et al., 2001; Manna et al., 2007; Poderoso et al., 2008) o *Cyp19a* (Shozu et al., 2001). También se han descrito acciones de las MAPKs opuestas a las mencionadas anteriormente (Seger et al., 2001; Tajima et al., 2003), donde el bloqueo de la ruta con PD98059 o U0126 tiene como consecuencia un incremento en la producción de esteroides y en la expresión de *StAR*.

En peces, hay pocos estudios que describan los mecanismos intracelulares que activan las GtHs para regular la síntesis de esteroides, a excepción de aquellos relacionados con la ruta del AMPc/PKA. Los únicos trabajos disponibles sobre la implicación de las MAPKs en la regulación de la síntesis de esteroides se limitan a dos especies: la corvina (*Micropogonias undulatus*) (Benninghoff y Thomas, 2006) y la carpa común (Paul et al., 2010). En ambos estudios se detectó que la activación de la ruta de la PKA mediante hCG o análogos del AMPc, como la forskolina o el (Bu)₂cAMP, incrementan la producción de esteroides acompañada por un aumento en la fosforilación de las MAPKs. En presencia de los inhibidores PD98059 o U01296, la fosforilación de las MAPKs se reduce, al igual que los niveles de T o E2. En ambos casos se puede deducir que hay comunicación entre la ruta AMPc/PKA y MAPK para regular la síntesis de esteroides.

1.7.2. Rutas alternativas de señalización

Además de la ruta del AMPc/PKA, existen otras rutas que actúan regulando la esteroidogénesis. Sin embargo, según lo descrito hasta el momento, esta acción es secundaria, menos evidente o menos estudiada que la ejercida por la ruta dependiente de AMPc. Entre esas otras rutas cabe destacar la de la PKC. La implicación de la PKC y su modo de actuación sobre la esteroidogénesis no están claros ya que se le ha adscrito tanto una función inhibidora

(Mukhopadhyay et al., 1984; Welsh et al., 1984) como estimuladora (Nishimura et al., 2004; Chaudhary y Stocco, 1988). Muchos de estos trabajos se han realizado empleando PMA, un estimulador de la PKC, y en algunos de ellos se ha visto que el tratamiento con PMA reduce la síntesis de algunos esteroides como la T, la 17 α -hidroxiprogesterona y la androstenediona, pero incrementa los niveles de otros como la pregnenolona (Stocco et al., 2005). Esto sugiere que el PMA actúa regulando la acción de la CYP17A (Jo et al., 2005), enzima responsable del cambio en la producción de E2 a progesterona que experimentan las hembras durante la maduración (Chen et al., 2010b). Además se ha observado que la estimulación de la PKC tiene un efecto mucho más importante en la regulación de la expresión de *Star* que sobre la producción de esteroides. Esto se debe a que la *Star* producida bajo la acción de PMA no está fosforilada y por eso no se detecta un gran efecto sobre la síntesis de esteroides (Stocco et al., 2005). De todo ello se deduce que la ruta de la PKC participa activamente en la síntesis de esteroides regulando la expresión de *Star*, pero para que esta enzima se fosfore y por lo tanto se active, es necesaria la presencia de la PKA, de otra manera, la síntesis de esteroides no es posible.

En hembras de carpín dorado se ha visto que la estimulación de la PKC genera una reducción en los niveles de esteroides inducidos por hCG o forskolina (Van der Kraak, 1990, 1992), pero su acción sobre los niveles basales de esteroides es estimuladora cuando la ruta del AMPc/PKA no está activada. En trucha (Planas et al., 1997), se vio que la acción de la PKC es bastante más compleja, ya que su activación bloquea la estimulación de los niveles de esteroides generada por la Lh o la Fsh en oocitos en proceso de maduración o pre-ovulatorios, mientras que la inhibición de la PKC reduce el nivel de esteroides producido por la acción de la Lh pero no por la de la Fsh. Estos resultados sugieren diferencias en la regulación de la PKC en función del estado de desarrollo.

Otra ruta de señalización descrita como relevante en el proceso de esteroidogénesis es la de la PKB, que se activa principalmente por Pi3K/Akt, aunque también se han descrito vías adicionales de activación de la PKB independientes de Pi3K (Filippa et al., 1999). En rata se ha demostrado que la FSH puede activar la PKB a partir de un incremento de AMPc, sin usar como mediador la PKA (González-Robayna et al., 1999) pero activando a la vez Pi3K. El bloqueo de la activación de PKB por parte de inhibidores para Pi3K como wortmannin y Ly 294002 confirman la dependencia de esa ruta (González-Robayna et al., 2000).

En células de la granulosa de rata se ha visto que la ruta PI3K/Akt está implicada en la síntesis de E2 bajo el estímulo de la FSH. Se ha comprobado que la FSH incrementa la expresión de *CYP19A* usando también como intermediaria la ruta de la PKB, sin embargo parece que la ruta del AMPc/PKA es esencial para la síntesis de E2, ya que su bloqueo con H89 no puede suplirse con una sobreexpresión de la ruta Pi3K/Akt (Zelevnik et al., 2003).

En peces existen pocos trabajos centrados en el estudio de la función de esta ruta en el proceso de esteroidogénesis. En el caso de la trucha, Paul et al. (2009) describen que la Igfl utiliza la ruta de la PKB para promover la maduración de los oocitos, mientras que en la corvina es imprescindible la activación de Pi3K/Akt en ese mismo proceso (Pace y Thomas, 2005).

1.8. Transferencia génica somática

En humanos es bastante común el uso de hormonas recombinantes para solventar problemas, ya sean hereditarios o adquiridos, asociados a deficiencias en determinadas proteínas, como son la hemofilia, la diabetes, las deficiencias en hormona de crecimiento o las relacionadas con el proceso reproductivo,. También en acuicultura desde hace varias décadas se realizan tratamientos con hCG (Miura et al., 1991a; Schiavone et al., 2006; Sorbera et al., 1999) para inducir la puesta y sincronizar machos y hembras. Sin embargo, algunos autores (revisado en Zohar y Mylonas, 2001) han visto que inyecciones sucesivas con hCG generan una pérdida de efectividad e incluso aparición de anticuerpos contra esta GtH. Como alternativa para inducir la puesta se ha planteado el uso de implantes con GnRH o sus agonistas como el LHRHa (Crim et al., 1983; Mylonas et al., 1995; Guzmán et al., 2011; Sorbera et al., 1996). Los avances actuales en biotecnología permiten producir gonadotrofinas recombinantes específicas de una determinada especie mediante procesos accesibles, existiendo para ello una gran variedad de sistemas de expresión, desde procariotas como *Escherichia coli* a eucariotas como levaduras, células de mamíferos o plantas (revisado en Levavi-Sivan et al., 2010). De esta manera se puede asegurar una respuesta específica sin provocar respuesta inmune. Por otro lado la producción de proteínas recombinantes es menos costosa en tiempo y dinero que la purificación de proteínas nativas, y además proporciona grandes cantidades, para tratamientos repetidos, en poco tiempo.

Una alternativa a la inyección de hormonas, ya sean nativas o recombinantes, es la transferencia génica transitoria. Esta técnica está basada en la introducción de DNA plasmídico desnudo en un tejido somático adulto, con el objetivo de alcanzar una expresión

duradera del gen de interés pero sin que llegue a integrarse en el genoma de las células (Tonheim et al., 2008). Por tanto, de manera opuesta a la transgénesis estable, donde se pretende que los genes se integren en las células de la línea germinal, en la transferencia génica somática los genes se incorporan a células somáticas, con lo que su expresión es por tiempo limitado y nunca se transmite a la descendencia. Esta técnica se puede usar como alternativa a la transgénesis estable cuando es necesaria la presencia de un producto génico específico por un espacio de tiempo corto, ya que su manejo es mucho más fácil y rápido que la obtención de transgénicos estables.

La primera descripción de transferencia génica somática realizada en un tejido adulto data de 1990, cuando Wolff y colaboradores inyectaron un DNA plasmídico desnudo en músculo de ratón. Transcurridos dos meses tras la inyección, las células musculares todavía conservaban la expresión del gen inyectado. Desde este primer trabajo se han probado numerosos tejidos diana en mamíferos, como la piel (Drabick et al., 2001), el hígado (Heller et al., 2000), la glándula tiroidea (Sikes et al., 1994), el músculo cardíaco (Kitsis et al., 1991), los órganos urogenitales (Yoo et al., 1999) e incluso inyecciones sistémicas (Dai et al., 2002). De todos ellos, el músculo es uno de los más convenientes para realizar terapia génica hormonal porque, además de ser un tejido muy extendido y accesible (Miyazaki y Miyazaki, 2008), presenta un riego sanguíneo abundante que permite secretar fácilmente las proteínas al torrente circulatorio.

Uno de los primeros problemas encontrados en esta nueva metodología fue que los niveles de expresión alcanzados eran relativamente bajos, a pesar de que las inyecciones tenían buena eficiencia. La solución fue usar virus en vez de plásmidos como vectores, puesto que mostraban tener una tasa de transferencia alta (Schmidt-Wolf y Schmidt-Wolf, 2003). La aparición de algunas complicaciones médicas después del tratamiento, en ensayos realizados en humanos (Raper et al., 2003), derivó los esfuerzos hacia la obtención de una metodología de transferencia más eficaz que incrementara los niveles de expresión, sin hacer uso de vectores virales, ya que además del riesgo que supone la manipulación de virus, estos desencadenaban respuesta inmune. Desde entonces han ido apareciendo multitud de métodos para mejorar la transferencia del DNA, tanto físicos (electrotransferencia, biolística, pistola génica, ultrasonidos) como químicos (polímeros y lípidos) (Niidome y Huang, 2002; Schmidt-Wolf y Schmidt-Wolf, 2003).

El uso de la electroporación como metodología para incrementar la transferencia génica en células de mamífero surgió por primera vez en 1982 (Neumann et al., 1982) y desde entonces su rápido desarrollo ha permitido su uso *in vivo* en terapia génica con fines médicos en

humanos. La idea primordial de esta técnica es incrementar la permeabilidad de la membrana celular a moléculas para las que normalmente es poco o nada permeable, y que por lo tanto son incapaces de cruzarla. Tras la administración de pulsos eléctricos las membranas de las células permanecen permeables por unos minutos, permitiendo entonces la penetración del DNA previamente inyectado. Es importante aclarar que si el DNA se inyectara tras el pulso eléctrico, la eficiencia sería mucho más baja y similar a la que se da en ausencia de pulso eléctrico (Mir, 2008).

Las inyecciones intramusculares, seguidas de la aplicación en el tejido de una serie de pulsos eléctricos, denominado electroporación *in vivo* de DNA o electrotransferencia, es una técnica que ya se ha usado en ratones (Lesbordes et al., 2002; Lucas y Heller, 2001; Vilquin et al., 2001), ratas (Terada et al., 2001; Yasui et al., 2001) y perros (Fewell et al., 2001) para transferir genes codificantes de hormonas, citoquinas y enzimas. Los resultados de todos estos trabajos han puesto en evidencia que esta técnica posee una gran capacidad para prolongar la expresión de los genes introducidos e incrementar la incorporación en las células del DNA inyectado. También se han probado en humanos inyecciones de DNA, con o sin electroporación, como tratamiento para determinadas enfermedades como la hemofilia A y B (Bettan et al., 2000; Fewell et al., 2001), la anemia crónica (Fattori et al., 2005; Rizzuto et al., 2000) y como terapia endocrina para suministrar hormona del crecimiento (Anwer et al., 1998; Xie et al., 2004) o insulina en diabéticos (Abai et al., 1999; Shaw et al., 2002).

De momento, en los peces, la aplicación más prometedora de la transferencia génica somática es como vacuna de DNA para inmunizar contra determinadas enfermedades infecciosas. Algunos trabajos en trucha (Boudinot et al., 1998; Corbeil et al., 2000; Heppel et al., 1998) y en salmón (Mikalsen et al., 2004) demuestran que las inyecciones con secuencias codificantes de proteínas antigénicas de la cubierta de ciertos virus pueden generar protección inmunológica frente a ellos. Desde 2005 existe una vacuna comercial basada en este principio para combatir el virus de la septicemia hemorrágica (VHSV) en salmones, llamada Apex-IHV $\square$, comercializada por Aqua Health Ltd (afiliada de Novartis) y autorizada en Canadá (Tonheim et al., 2008). También se ha logrado el desarrollo de inmunocompetencia en trucha contra VSHV tras la inyección de una construcción codificante para un anticuerpo de cadena única (Lorenzen et al., 2000).

Las inyecciones de DNA plasmídico tienen un gran potencial, no solo desde una perspectiva de inmunoprofilaxis, sino que también pueden plantearse como una alternativa a los

tratamientos hormonales tradicionales de igual manera a lo ensayado en mamíferos. En peces ya se ha demostrado que el músculo puede ser un buen lugar para inyectar plásmidos de DNA. En trabajos previos con lubina (Muñoz et al., 2013), trucha arcoíris (Anderson et al., 1996), pez cebra (Tan y Chan, 1997), salmón (Gómez-Chiarri y Chiaverini, 1999), pez gato (Dijkstra et al., 2001) y dorada (Verri et al., 2003), se ha detectado la incorporación del DNA inyectado en las células, así como la síntesis de la proteína codificada. Sin embargo, hasta la fecha, no existen trabajos que enmarquen esta metodología como terapia hormonal.

Capítulo 2. OBJETIVOS

2. Objetivos

Esta Tesis Doctoral tiene como objetivo principal contribuir al conocimiento de la función de la hormona gonadotropa Fsh en la espermatogénesis de la lubina. Para su consecución se han realizado experimentos *in vivo* donde se ha comparado la actividad de la Fsh con la de la Lh, de manera aislada o combinando ambas hormonas. Ello ha permitido perfilar el papel diferencial de cada una durante el proceso reproductivo en machos de lubina. Además, los experimentos *in vitro* han permitido pormenorizar el control que ejerce la Fsh en el proceso de síntesis de esteroides. Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos expuestos en cada uno de los siguientes capítulos de la memoria:

Capítulo 3:

1. Confirmar la actividad biológica *in vivo* de una gonadotrofina Lh recombinante de cadena única.
2. Establecer la metodología de transferencia génica somática como terapia génica en peces usando secuencias codificantes de gonadotrofinas,.
3. Determinar la función de la Lh en machos adultos de lubina durante la espermiación.

Capítulo 4:

1. Estudiar la función de la Fsh en machos de lubina mediante el uso de una Fsh recombinante o su plásmido codificante.
2. Efecto de la Fsh sobre los niveles de 11KT en el plasma de machos juveniles de lubina.
3. Efecto de Fsh sobre la expresión de genes relacionados con la espermatogénesis.
4. Efecto de la administración de Fsh sobre la morfología gonadal de machos juveniles de lubina.

Capítulo 5:

Estudiar del efecto de la administración aislada o combinada de Fsh y/o Lh sobre:

1. Los niveles plasmáticos de 11KT.
2. El nivel de expresión en testículo de genes relacionados con la espermatogénesis.
3. El nivel de expresión en testículo de genes relacionados con la esteroidogénesis.
4. El nivel de expresión en testículo de otros factores paracrinicos para determinar la función de ambas gonadotrofinas en la recrudescencia gonadal de machos juveniles de lubina.

Capítulo 6:

1. Caracterizar la implicación de las rutas de señalización intracelular AMPc/PKA y MAPK en la transducción de la señal de la Fsh.
2. Estudiar el efecto del bloqueo de AMPc/PKA y MEK sobre:
 - 2.1 La producción de esteroides.
 - 2.2 Los niveles de expresión de genes relacionados con la esteroideogénesis.
2. Comparar la acción *in vitro* de la Fsh sobre testículos y ovarios de lubina y de pez cebra para identificar mecanismos de control de esta hormona sobre la esteroidogénesis conservados entre especies.

Capítulo 3:

La terapia con un plásmido que codifica Lh genera un aumento de Lh circulante de larga duración y un incremento en la producción de esperma en la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*)

Publicado como: Mazón, MJ., Zanuy, S., Muñoz, I., Carrillo, M., Gómez, A. 2013. Luteinizing Hormone Plasmid Therapy Results in Long-Lasting High Circulating Lh and Increased Sperm Production in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Biology of Reproduction** 88 (2): 1-6

Resumen

En este capítulo se pretende evaluar el potencial de la inyección intramuscular de un gen codificante de una hormona como una estrategia de terapia génica en peces. El gen escogido consistía en la secuencia codificante de la hormona luteinizante en forma de cadena única, todo ello contenido en un plásmido de expresión (pCMV-scLh) y la lubina se escogió como especie de pez objeto de estudio. La inyección *in vivo* del plásmido pCMV-scLh en músculo de juveniles de lubina generó niveles de Lh en plasma superiores a 50 ng/ml en el 40% de los peces inyectados, mientras que estos mismos niveles sólo se alcanzaron en el 4% de los peces del grupo control. Cuando se trataron reproductores espermiantes mediante esta misma técnica, éstos produjeron una Lh activa capaz de aumentar la producción de esperma sin afectar a su calidad en términos de densidad. En comparación con la inyección de Lh recombinante de cadena única, la inyección de plásmido provocó niveles de Lh en plasma más elevados y de duración más larga. Estos resultados demuestran que el músculo esquelético de lubina es capaz de incorporar el DNA plasmídico y de secretar la proteína codificada al torrente sanguíneo. Por lo tanto, se propone la transferencia génica somática como una tecnología realista de terapia hormonal para tratar disfunciones provocadas por niveles hormonales insuficientes en peces o simplemente para sincronizar las puestas.

3.1. Introducción

En humanos está muy extendido el uso de proteínas nativas purificadas o recombinantes para tratar deficiencias, heredadas o adquiridas, de proteínas plasmáticas. Además es un hecho conocido que las proteínas nativas se eliminan fácilmente de la circulación, por lo que para obtener resultados significativos hay que administrarlas frecuentemente. Una buena alternativa a este problema es el uso de péptidos recombinantes modificados de manera que presenten mayor resistencia a la degradación y una vida media más larga en circulación (Adams y Boime, 2008). Sin embargo, la disponibilidad de proteínas recombinantes purificadas presenta varios cuellos de botella, como la necesidad de altos niveles de producción, la complejidad de los métodos de purificación o la presencia de modificaciones post-traduccionales que garanticen su funcionalidad (Sethuraman et al., 2006). En consecuencia, la producción de dichas proteínas es cara, su disponibilidad puede ser limitada y su administración poco conveniente (Tripathy et al., 1996). Una solución potencial capaz de resolver las deficiencias en ciertas proteínas plasmáticas es la terapia génica (Ratanamart y Shaw, 2006). La transferencia génica somática se basa en la introducción y expresión de un gen exógeno en un tejido adulto sin que éste se incorpore de forma permanente en el genoma o altere el sistema inmunológico (Tonheim et al., 2008). En 1990, Wolff y sus colaboradores demostraron que el DNA desnudo era capaz de entrar en las células y expresarse tras su inyección en músculo esquelético. Desde entonces, esta técnica se ha probado en numerosos tejidos con resultados satisfactorios (Escoffre et al., 2010). No obstante, el músculo sigue siendo uno de los lugares más interesantes para la expresión de genes con fines terapéuticos. Principalmente porque es un tejido accesible y abundante con mucha irrigación sanguínea (Miyazaki y Miyazaki, 2008). Esto lo convierte en un sistema efectivo para la liberación de proteínas al torrente sanguíneo. Con respecto a los vectores utilizados para distribuir el gen exógeno, la transferencia génica mediada por virus ha sido la más aplicada en mamíferos dada su alta tasa de transferencia (Kay, 2011). Sin embargo, las complicaciones médicas causadas por los vectores virales (Raper et al., 2003) han hecho que los esfuerzos se concentren en el uso de vectores no virales, como el DNA desnudo (Niidome et al., 2002). Los vectores no virales, generalmente basados en plásmidos de expresión, pueden albergar fragmentos de DNA de mayor tamaño que los virales y son más sencillos de preparar, aunque su baja tasa de transferencia supone un problema. Con el fin de aumentar la incorporación de DNA plasmídico en las células diana se han probado varios métodos físicos y transportadores químicos (Niidome et al., 2002). En concreto, para transportar el DNA codificante de varias

hormonas, citoquinas y enzimas al interior celular se ha usado la electroporación o electrotransferencia de DNA *in vivo* en ratones (Lucas y Heller, 2001; Vilquin et al., 2001; Lesbordes et al., 2002), ratas (Terada et al., 2001; Yasui et al., 2001), y perros (Fewell et al., 2001).

Hasta la fecha, se han hecho ensayos de terapia génica basados en DNA desnudo en modelos de mamífero para curar enfermedades causadas por déficits de proteínas circulantes, como la hemofilia tipo A y B (Bettan et al., 2000; Fewell et al., 2001) y la anemia crónica (Rizzuto et al., 2000; Fattori et al., 2005), o por deficiencias hormonales, como las debidas a falta de hormona del crecimiento (Anwer et al., 1998; Xie et al., 2004), o de insulina (Abai et al., 1999; Shaw et al., 2002). Sin embargo, en peces, esta técnica se ha desarrollado muy poco y su aplicación se ha restringido a la inmuno-profilaxis, fundamentalmente como una protección frente a infecciones virales mediante la inyección de la secuencia codificante de una proteína antigénica del virus. Esta estrategia se ha probado con éxito en varias especies de peces cultivados como la trucha arcoíris, el salmón atlántico, la platija japonesa (*Paralichthys olivaceus*), la carpa, el pez gato y el rodaballo (*Psetta maxima*) (revisado en Kurath et al., 2008). De hecho, existe una vacuna para tratar al salmón atlántico contra el IHNV (virus de la necrosis hematopoyética infecciosa) (Apex-IHV®, AquaHealthLtd) que está comercializada en Canadá desde 2005 (Tonheim et al., 2008). Otra estrategia utilizada en la vacunación de peces consiste en la inyección de una construcción génica que codifica un anticuerpo neutralizante de cadena única (Lorenzen et al., 2000), siendo éste el único estudio en peces donde se ha detectado y evaluado la secreción de una proteína en sangre. Estas y otras investigaciones que usan genes marcadores en distintas especies de peces como la trucha arcoíris (Anderson et al., 1996), el pez cebra (Tan y Chan, 1997), el salmón atlántico (Gómez-Chiarri y Chiaverini, 1999), el bagre de vidrio (*Kryptopterus bicirrhus*) (Dijkstra et al., 2001) y la dorada (Verri et al., 2003), demuestran el potencial del músculo como tejido diana para realizar inyecciones con DNA plasmídico en peces.

Esta metodología, además de su uso para vacunación donde la expresión del gen a corto plazo es suficiente para provocar la respuesta inmunológica (Tonheim et al., 2008), tiene utilidad como método de expresión génica a largo plazo para realizar tratamientos locales o sistémicos, como alternativa a la administración continuada de hormonas recombinantes o nativas. El aumento del número de genes de peces identificados y secuenciados en los últimos años, no se ha reflejado en un desarrollo similar en la producción de las correspondientes proteínas recombinantes. Este hecho ha ralentizado el progreso de estudios funcionales *in*

vivo e *in vitro* en peces y, en consecuencia, el desarrollo de estrategias biotecnológicas similares a aquellas que administran hormonas recombinantes en biomedicina y en menor medida en ganadería (Andersen y Krummen, 2002). Por tanto, el propósito de este trabajo era examinar, por vez primera en peces, el uso de la transferencia génica directa en músculo como una aproximación de terapia génica para tratamientos sistémicos con hormonas endocrinas. A tales efectos se expresó en músculo de lubina, de manera transitoria, el gen codificante de la hormona luteinizante de lubina en forma de cadena única (scLh). Como control positivo se usó esta Lh recombinante de cadena única producida en un sistema de células eucariotas. La capacidad del músculo del pez para secretar la proteína codificada al torrente sanguíneo se evaluó midiendo los niveles de Lh en plasma y su acción fisiológica se determinó analizando los niveles 11KT en plasma y del volumen de esperma producido.

3.2. Material y métodos

3.2.1. Animales

Se utilizaron ejemplares juveniles (peso medio: 54 ± 4 g) y machos adultos de tres años (peso medio: 700 ± 46 g) de lubina europea criados en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal. Los experimentos se llevaron a cabo durante la época reproductiva entre diciembre y marzo y bajo fotoperiodo natural (40°N; 0°E). Tanto los juveniles como los adultos se marcaron individualmente (Fish Eagle PIT tags, USA) en la cavidad intraperitoneal o en la musculatura dorsal, respectivamente. Antes del tratamiento, los peces se anestesiaron en fenoxietanol (0.5ml/l de agua). Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a la normativa de la Unión Europea para experimentación animal.

3.2.2. Plásmidos de expresión

El plásmido pCMV-scLh (o pcDNA3-scLh) contiene un cDNA donde están fusionadas en fase las secuencias codificantes de las subunidades alfa y beta de la Lh de lubina. Todo ello ligado a la secuencia codificante del péptido carboxilo terminal (CTP) de la subunidad beta de la hCG. Este plásmido expresa esta Lh de cadena única de lubina bajo el control del promotor-potenciador del citomegalovirus (CMV) (Molés et al., 2011b). El plásmido pCMVtk-LacZ contiene el gen de la beta-galactosidasa de *Escherichia coli* bajo el control del potenciador CMV en combinación con el promotor de la timidinaquinasa (Tk) del virus del herpes simple (Friedenreich y Scharf, 1990).

El DNA plasmídico para las inyecciones se obtuvo de la siguiente manera. Se crecieron en medio LB los clones de *E.coli* DH5 α conteniendo los plásmidos citados anteriormente. A continuación el DNA se purificó empleando columnas de cromatografía de intercambio aniónico (Megapreps, Qiagen Inc., Chatswoth, CA, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.3. Producción de la gonadotrofina recombinante scLh de lubina

La scLh recombinante de lubina se obtuvo de un clon estable de células ováricas de hámster chino (CHO) que expresa de manera constitutiva el plásmido pCMV-scLh (Molés et al., 2011b). La producción de hormona se llevó a cabo de acuerdo a Schatz, et al. (2003); el clon estable de CHO-scLh se cultivó en frascos de 75cm² hasta alcanzar una confluencia del 80%-90% con medio Dulbecco modificado (DMEM) (Invitrogen Corp) complementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina y suero fetal bovino (FBS) al 5%. Después el medio se sustituyó por Advanced-DMEM (Invitrogen Corp) libre de suero que contenía penicilina, estreptomicina y glutamina al 1% y se mantuvo durante siete días a 25°C y con atmosfera de CO₂ al 5%. Finalmente, el medio de cultivo se recogió y concentró usando dispositivos de filtración de 30kDa (Centricon Plus-20, Millipore) y se cuantificó.

3.2.4. Diseño del experimento y toma de muestras

Para valorar la fiabilidad de la transferencia génica en el músculo de peces como un método de administración de gonadotrofinas se realizaron dos experimentos.

El experimento 1 examinó el efecto de la inyección intramuscular del plásmido pCMV-scLh sobre los niveles de la Lh en el plasma de juveniles de lubina. Para ello se distribuyeron cuarenta y ocho ejemplares en tres tanques de fibra de vidrio de 500 l que correspondían a tres grupos experimentales: control no tratado (grupo Control) (n = 12), control de inyección de pCMVtk-LacZ (grupo LacZ) (n=11) y grupo inyectado con pCMV-scLh (grupo pscLH) (n=25). Debido a que la temperatura natural (14.5°C) del agua podía ser demasiado baja para que la incorporación del plásmido al músculo de la lubina fuese efectiva, una semana antes del experimento los peces se aclimataron a 19°C y se mantuvieron en esa temperatura a lo largo de éste. Los individuos se anestesiaron y se inyectaron con 100 μ g del plásmido correspondiente diluido en 100 μ l de una solución de suero salino (PBS) a 1x. La inyección de DNA se practicó en la zona rostroventral, a la altura de la aleta dorsal y por encima de la línea lateral, mediante una aguja del calibre 26 $\frac{1}{2}$ gauge. Los peces recibieron dos

inyecciones, a día 0 y a día 3. Las muestras de sangre se recogieron los días 0 y 3, y después semanalmente durante treinta días tras la primera inyección.

En el segundo experimento se monitorizó el efecto del tratamiento con pCMV-scLh sobre la producción de esperma. Para ello se distribuyeron machos de lubina de tres años de edad en cuatro tanques de fibra de vidrio de 500 l, que correspondían a cuatro grupos experimentales: control no tratado (grupo Control) (n=9), control inyectado con pCMVtk-LacZ (grupo LacZ) (n=9), inyectado con pCMV-scLh (grupo pscLH) (n=12) y un control positivo inyectado con scLh recombinante (grupo scLH) (n=11). Los grupos pscLH y LacZ se inyectaron intramuscularmente los días 0 y 3 con 200 µg/pez de plásmido diluido en 150 µl de PBS1x. Para mejorar la incorporación del plásmido y tener la certeza de que ésta fuera uniforme, los grupos pscLH y LacZ recibieron 8 pulsos cuadrados de electroporación de 100 V/cm y 20 ms de duración, alrededor de la zona de inyección del DNA, inmediatamente después de ésta. Se usaron electrodos del tipo *Needle-array* (2-Needle Array modelo 531, BTX) y un generador ECM 830 (BTX). El grupo scLH también recibió dos inyecciones intramusculares los días 0 y 3 con 200 ng/pez de hormona recombinante en 150 µl de PBS1x. Durante el experimento el grupo scLH se mantuvo a temperatura natural (14±2°C), pero los grupos Control, LacZ y pscLH estuvieron a 17°C desde la semana antes de la primera inyección hasta el final del experimento, para asegurar la incorporación del DNA. Esta temperatura no afecta a la reproducción del macho de lubina (Carrillo et al., 1995). Las muestras de sangre se tomaron los días 0 y 3 tras la primera inyección y después semanalmente hasta el día 34. Asimismo se recogieron muestras de esperma dos días antes de la primera inyección y semanalmente hasta el día 34. Este periodo cubre ampliamente el tiempo de respuesta a la inducción de la espermiación previamente observado en la lubina (Sorbera et al., 1996; Rainis et al., 2003). Antes de obtener el esperma, la zona genital se limpió con agua dulce y se secó cuidadosamente. El esperma se obtuvo mediante masaje abdominal y se recogió individualmente en tubos de 15 ml conectados a una bomba de vacío y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

En ambos experimentos, las muestras de sangre se obtuvieron por punción en la zona caudal de peces anestesiados previamente. El plasma se extrajo mediante centrifugación (2500xg, 30min 4°C) y se almacenó a -20°C hasta el análisis hormonal posterior.

3.2.5. Análisis hormonal

La cuantificación de la hormona recombinante y de los niveles de Lh en plasma se determinó mediante un ELISA específico validado para lubina (Mateos et al., 2006). La sensibilidad del ensayo fue de 0.65 ng/ml (Bi/Bo = 80%). Los niveles de 11KT en plasma se analizaron mediante un enzimoimmunoensayo (EIA) desarrollado en nuestro laboratorio (Rodríguez et al., 2005). Para este ensayo se empleó un anticuerpo amablemente cedido por el Dr. A. Fostier (INRA, Rennes, Francia) a dilución 1:320.000 y un trazador para 11KT (Cayman Chemicals, MI, USA) diluido a 1:10 Unidades Ellmans (EU)/ml. Los esteroides se extrajeron del medio de cultivo con metanol y se distribuyeron 50 µl de cada muestra en placas de 96 pocillos revestidos con 150 µl de anticuerpo anti-conejo producido en ratón a dilución 1:1800. A continuación se distribuyeron el anticuerpo primario y el trazador y las placas se incubaron a 22 °C durante 2 h. Tras varios lavados se añadieron 200 µl de reactivo de Ellmans a todos los pocillos y la reacción enzimática se desarrolló durante 4 h a 22 °C en oscuridad. La absorbancia se midió a 405 nm mediante un lector de microplaca. La sensibilidad del este ensayo fue de 1.75 pg/pocillo.

3.2.6. Análisis de las muestras de esperma

La densidad del esperma se determinó inmediatamente después de su recogida. Para evitar la agregación del mismo y obtener la concentración apropiada, éste se diluyó a 1:2000 en un diluyente de esperma (Fauvel et al., 1999). La densidad espermática se analizó en 2 µl de mezcla situados en una cámara de Neubauer y usando un objetivo 20x de contraste de fase negativo (Nikon Plan Flour) en un microscopio Nikon Eclipse E400. Las imágenes se tomaron con una videocámara Sony CCD-IRIS y se grabaron para su posterior análisis mediante (L) Integrated Semen Analysis System, (PROiSER R+D, Buñol, Valencia, España).

3.2.7. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron con el programa Sigma Stat 3.5 (SPSS. Inc., Illinois, USA). Los resultados se expresaron como valores medios $\pm$ s.e.m (error estándar de la media). Se comprobó la normalidad de la distribución mediante el test de Kolgomorov-Smirnoff tras transformación logarítmica de los datos si se requería. Para establecer la homogeneidad de las varianzas se utilizó el test de Bartlett. Los datos correspondientes a los niveles de Lh, 11KT y densidad de esperma se analizaron mediante un ANOVA de dos vías, seguido por el test de Holm-Sidak. La producción de esperma se expresó como la suma del promedio del volumen

de esperma referido al peso corporal y recogido en cada punto de muestreo. Las diferencias entre tratamientos se analizaron mediante la prueba del chi cuadrado. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$.

3.3. Resultados

3.3.1. Secreción de Lh en el plasma de los animales inyectados con el plásmido de scLh

Con el fin de determinar la capacidad de las células musculares para producir y secretar al torrente sanguíneo la hormona codificada por el plásmido pCMV-scLh, y para evaluar si era posible obtener niveles fisiológicos de hormona en plasma, se inyectaron ejemplares juveniles de lubina con el plásmido mencionado y se analizaron los niveles de Lh en plasma.

Aunque algunos ejemplares del grupo pscLH mostraron un incremento significativo de Lh en plasma tres días después de la primera inyección, los niveles más elevados se observaron a los 7, 14 y 20 días (Fig. 3.1). Después se detectó una reducción importante, y a los 30 días los niveles de Lh fueron similares a los de los controles. Además, durante el experimento, los grupos Control y LacZ no mostraron cambios en los niveles de Lh (Fig. 3.1). El marcaje individual de los peces permitió observar la dinámica individual de secreción de Lh e identificar las inyecciones fallidas. De esta forma se observó que los ejemplares del grupo pscLH mostraban una variabilidad alta en los niveles plasmáticos de Lh, en respuesta a la inyección. Hubo peces tratados que mostraron niveles de Lh en plasma de 1 a 2 órdenes de magnitud más elevados que los controles y otros que mostraron niveles similares a éstos. Aproximadamente el 58% de los peces control mostraron niveles de Lh menores a 10 ng/ml y sólo el 4% superaron los 50 ng/ml. Entre los peces tratados con pscLH, el 44% mostraron un rango de entre 20-100 ng de Lh/ml y el 24% tuvieron valores de Lh mayores de 100 ng/ml.

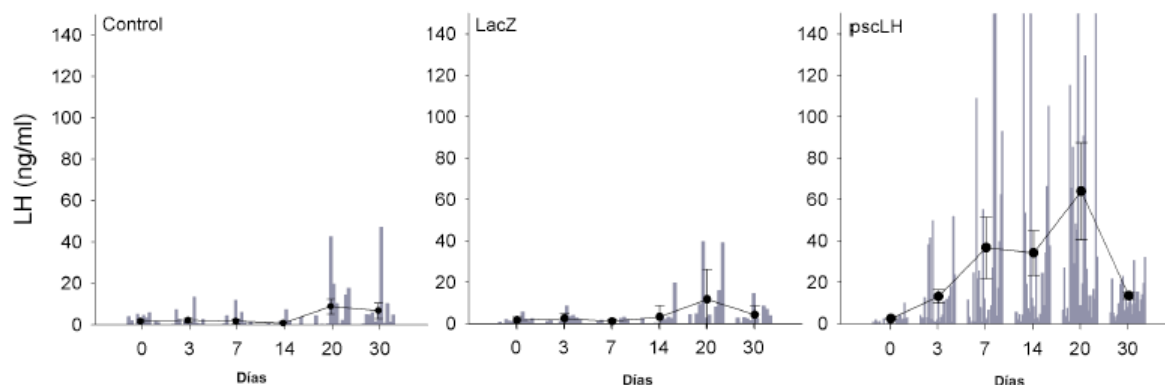


Figura 3.1. Niveles de Lh en plasma (ng/ml) de ejemplares juveniles de lubina: Animales no tratados (gráfica Control, n=12), inyectados con pCMVtk-LacZ (gráfica LacZ, n=11) o inyectados con pCMV-scLh (gráfica pscLh, n=25). Cada barra vertical representa un animal. Las líneas continuas representan la media $\pm$ SEM de los individuos para cada punto de muestreo.

3.3.2. Cambios en los niveles de Lh en plasma en ejemplares adultos inyectados

Una vez demostrado que la inyección intramuscular del plásmido pCMV-scLh daba lugar a un aumento de los niveles de Lh en ejemplares jóvenes, se evaluó esta estrategia en machos adultos durante la etapa reproductiva. Además se comparó la biodisponibilidad de la hormona codificada en el plásmido, con la dinámica de una Lh recombinante inyectada. Para ello los animales se organizaron en cuatro grupos de peces experimentales inyectados con: pCMV-scLh, pCMVtk-LacZ, proteína scLh recombinante y no inyectados. Para reducir la variabilidad en la incorporación de DNA, observada en los ejemplares jóvenes (Fig.3.1, Tabla 1), se aplicaron pulsos de electroporación, ya que la incorporación del DNA y la expresión es menos efectiva en peces grandes que en peces de menor tamaño (Hansen et al., 1991).

En la figura 3.2 se muestran los niveles de Lh en el plasma de los machos adultos de lubina. En el grupo control, los niveles de Lh fueron altos durante la primera semana, lo cual está de acuerdo con lo esperado en adultos en espermiación (Rocha et al., 2009; Mañanós et al., 2002). El tratamiento con scLh recombinante y con pCMV-scLh generó niveles de Lh mayores que en el grupo control y con un perfil distinto. En el grupo pscLh, se observó un incremento de Lh en plasma que varió desde 0.84 ± 0.3 ng/ml el día 0 a 8.97 ± 1.36 ng/ml el día 13, cuando se observaron los niveles más elevados. A partir de ese momento los valores decrecieron, aunque 34 días después de la primera inyección todavía eran significativamente más elevados que en los otros grupos. Los peces tratados con scLh, mostraron valores iniciales de Lh de 4.6 ± 0.8 ng/ml, que aumentaron el día 6 y alcanzaron su máximo de $6.8 \pm$

0.6 ng/ml el día 13. En los días subsiguientes decayeron hasta 2 ng/ml. Los peces control mostraron niveles de Lh parecidos, hubo un incremento no significativo entre los días 0 y 6, seguido de una disminución significativa el día 13 y manteniéndose los niveles bajos hasta el final del experimento. La electroporación *in vivo* de los animales adultos redujo drásticamente la variabilidad de la respuesta al tratamiento con el plásmido. En la Tabla 1 se muestran los porcentajes de los peces que respondieron o no al tratamiento en ambos experimentos. En los machos adultos la electroporación generó un 100% de respuesta positiva desde el día 14 hasta el final del experimento. En los juveniles el porcentaje más alto entre los especímenes positivos se obtuvo el día 7 (60%).

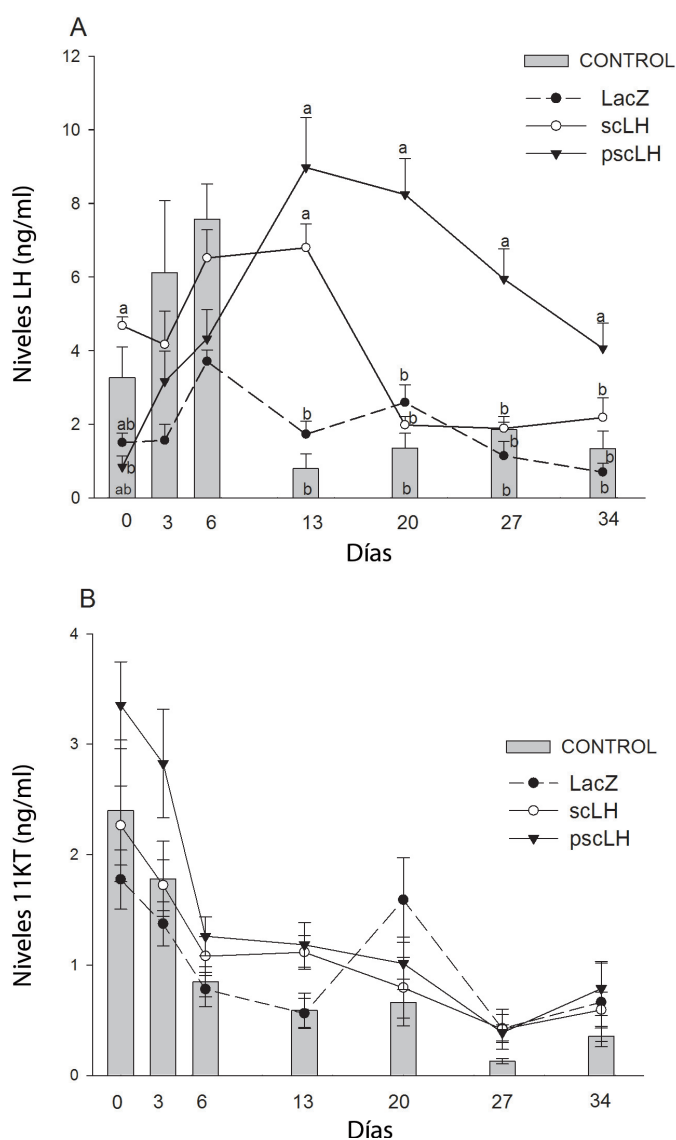


Figura 3.2. Niveles hormonales en machos adultos de lubina. **(A)** Niveles de Lh en plasma (ng/ml). **(B)** Niveles de 11KT en plasma (ng/ml). Los niveles hormonales se representan como media $\pm$ SEM de entre 7 a 14 peces. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos, para cada punto de muestreo ($P < 0.05$, Anova de una vía). CONTROL, no inyectados. LacZ, inyectados con pCMVtk-LacZ. scLH, tratados con hormona recombinante scLh. pscLH, inyectados con pCMV-scLh.

Tabla 3.1. Porcentaje de peces que respondieron a la inyección con pscLH

	Día 3		Día 7		Día 14		Día 20		Día 27		Día 34	
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
JUVENILES	44	56	60	40	44	56	52	48	ND	ND	8	92
ADULTOS	7	93	23	77	100	0	100	0	100	0	100	0

(+): pez respondedor. (-): pez no respondedor. Los peces con niveles de Lh dos veces superiores a la desviación estándar del valor medio del grupo control se consideraron como respondedores. ND: no dato.

3.3.3. Efecto funcional de la Lh producida por el músculo

Tras observar que la hormona sintetizada por las células musculares de ejemplares adultos también llegaba al torrente sanguíneo, era fundamental evaluar sus efectos fisiológicos. El papel clave de la Lh en la reproducción del macho de lubina, es regular los estadios finales de la maduración de las células germinales y la espermiación (Mañanós et al., 2002; Rocha et al., 2009). Por ello se evaluó el efecto de las inyecciones de plásmido pCMV-scLh y de scLh sobre la producción de esperma y su densidad en los machos adultos tratados. El volumen total de esperma recogido durante el experimento se representa en la figura 3.3A. Ambos tratamientos, scLh y pCMV-scLh, tuvieron la misma eficacia en la producción de esperma, ya que provocaron un aumento significativo en comparación con los controles. Además, las inyecciones de scLh y pCMV-scLh produjeron un incremento sustancial de la densidad del esperma respecto a los grupos control (Fig. 3.3B), sin embargo no se observaron diferencias entre ambos tratamientos con Lh. Además, en los grupos de peces adultos, se midieron los niveles de 11KT antes de las inyecciones y durante todo el experimento, con el fin de evaluar el efecto potencial de la Lh recombinante en la producción de este andrógeno. Todos los grupos mostraron perfiles parecidos (Fig. 3.2B). Los niveles de 11KT fueron elevados al principio del experimento decayendo de manera constante hasta alcanzar niveles basales al final del periodo de espermiación. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales.

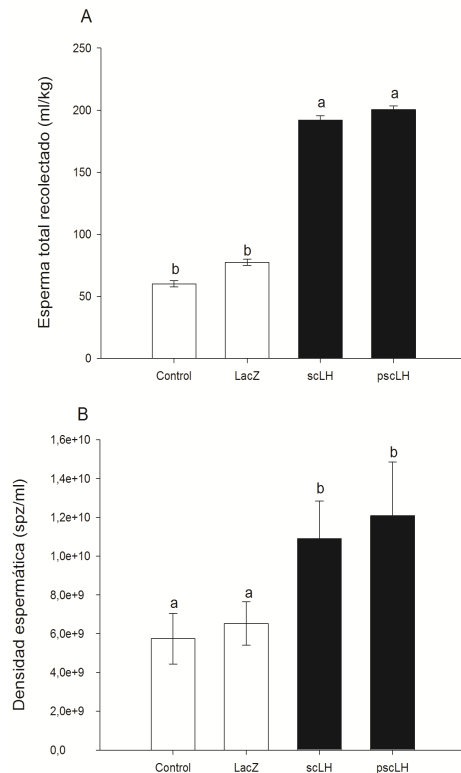


Figura 3.3. (A) Volumen total de esperma recogido (ml/kg) durante el experimento. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM. Letras distintas indican diferencias significativas ($P<0.05$, test Chi-cuadrado). (B) Densidad espermática en espermatozoides por mililitro (spz/ml). Los datos se representan como la media $\pm$ SEM. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos ($P<0.05$, Anova de una vía, Test Holm-Sidak). Grupos: Control, no inyectado; LacZ, inyectado con pCMVtk-LacZ; scLH, inyectado con scLh recombinante; pscLH, inyectado con pCMV-scLh.

3.4. Discusión

Que nosotros sepamos, este trabajo es la primera aplicación fisiológica de la terapia génica en peces. En este capítulo se demuestra la secreción, de manera eficaz al torrente sanguíneo, de una hormona recombinante fisiológicamente activa tras inyectar su secuencia codificante en el músculo. Como secuencia génica, para evaluar la efectividad de esta metodología en peces, se usó la codificante de la hormona luteinizante de la lubina y su músculo esquelético como órgano diana. En primer lugar, las inyecciones en ejemplares jóvenes de lubina mostraron que sus células musculares incorporaban el plásmido de expresión de scLh sintetizando y liberando esta scLh a la circulación sistémica. Sin embargo se observó una gran variabilidad en la respuesta a la inyección de DNA entre los ejemplares. Además, la inyección del mismo plásmido en machos reproductivamente activos demostró que la scLh producida por sus células musculares era biológicamente activa. La aplicación de electroporación *in vivo* tras la inyección incrementó el porcentaje de peces que respondieron positivamente a la inyección de DNA, reduciendo, por tanto, la variabilidad observada en los ejemplares jóvenes.

Estudios anteriores en peces, usando genes marcadores (Gómez-Chiarri y Chiaverini, 1999; Verri et al., 2003), habían demostrado que tras la inyección intramuscular de un plásmido de expresión, ésta persiste en el músculo; además, esta técnica se había orientado a aplicaciones profilácticas (revisado en Tonheim et al., 2008). Sólo existe un estudio relacionado con vacunación con la finalidad de que el producto codificado en el plásmido inyectado se secrete

al torrente sanguíneo. En ese estudio, Lorenzen y colaboradores (2002) inyectaron en el músculo de trucha un gen que codificaba un anticuerpo de cadena única neutralizante de VHSV (virus de la septicemia hemorrágica viral). Este anticuerpo se detectó posteriormente en suero proporcionando protección específica contra VHSV.

En los experimentos de este capítulo, con juveniles de lubina, se detectó una gran variabilidad de la respuesta a la inyección entre los animales. Para obtener resultados más uniformes, en el grupo adulto, tras la inyección se aplicaron pulsos cuadrados de electroporación, ya que, como se ha documentado anteriormente ésta mejoró la expresión de los genes inyectados en lubinas adultas en invierno (Muñoz et al., 2013). La electroporación de tejidos de peces para aumentar la permeabilidad de las células al DNA sólo se había ensayado en pez cebra, pero el procedimiento de electroporación usado difiere del nuestro (Tawk et al., 2002; Rambabu et al., 2005; Lin et al., 2009). La diferencia entre el tamaño del pez cebra y la lubina hace necesario el uso de diferente tipo de electrodos por lo que resulta difícil extrapolar las condiciones. Dado que en peces no existe un protocolo estandarizado para la electrotransferencia *in vivo*, y considerando que intensidades altas del campo eléctrico pueden causar necrosis celular y disminuir la expresión génica (Trollet et al., 2008), se administraron menos pulsos con un voltaje inferior (8 pulsos a 100V/cm). Con este protocolo de electroporación se redujo la variabilidad entre individuos y se obtuvo una respuesta uniforme a la inyección del DNA plasmídico. En el futuro se deberían evaluar otras condiciones parecidas a las propuestas por otros autores que sugieren el uso de corrientes de voltaje alto y pulsos cortos (Vicat et al., 2000) para generar una expresión génica duradera en el músculo.

En este estudio, todos los peces inyectados con pCMV-scLh mostraron incrementos significativos de los niveles de Lh en plasma en comparación con los controles. Sin embargo, se encontraron diferencias entre los grupos adultos y juveniles en cuanto al nivel máximo de Lh en plasma y el tiempo de respuesta. Cerca del 68% de los peces juveniles del grupo pscLH mostraron niveles de Lh en plasma mayores de 20 ng/ml y algunos de ellos alcanzaron el máximo tan sólo 7 días después de la inyección. En los adultos, el máximo valor detectado fue de 17 ng de Lh/ml, que es más bajo que los niveles encontrados en ejemplares juveniles, pero suficiente para incrementar la liberación de esperma. Las diferencias en el nivel de Lh en plasma observadas entre juveniles y adultos pueden ser debidas a la cantidad relativa de plásmido inyectado. La relación entre el DNA inyectado y el peso corporal era mucho menor en los animales adultos (0.57 µg de DNA / g de peso corporal) que en los juveniles (4 µg de DNA / g de peso corporal). Además, se sabe que tras la inyección de un plásmido la

expresión génica es significativamente menos eficiente en peces grandes que en pequeños (Hansen et al., 1991), tal como sucede en otros animales (Levy et al., 1995). Este hecho se relaciona con la existencia de una trayectoria más larga dentro de las miofibrillas de los animales de mayor tamaño, de manera que las moléculas de plásmido tienen que invertir más tiempo hasta penetrar en el núcleo. Por otro lado, diversos trabajos sugieren que la electrotransferencia puede prolongar el periodo de expresión, potenciar la incorporación de DNA en las células (Bettan et al., 2000; Vicat et al., 2000), y aumentar la expresión entre 100 y 1000 veces (Draghia-Akli et al., 2004) y como consecuencia mejorar la eficiencia de la inyección de plásmido. En este estudio, transcurrido un mes desde la inyección, el contenido de Lh en el plasma de los animales electroporados era todavía significativamente mayor que en los ejemplares control; por el contrario en los peces sin electroporar la Lh se acercaba a niveles basales tras el mismo periodo de tiempo. Este hecho indica que la electroporación podría influir en la duración del efecto del gen, aunque esto solo se puede afirmar, de manera concluyente, si se comparan animales del mismo tamaño.

Una de las diferencias más destacadas al comparar la inyección de plásmido pCMV-scLh con la administración directa de la proteína recombinante es la persistencia de la scLh en el torrente sanguíneo. Para estas inyecciones se eligió una Lh en forma de cadena única producida por células de mamífero porque en trabajos previos se vio que tenía una vida media *in vivo* más larga que otras formas recombinantes, y que tras la inyección estaba disponible en sangre en menos de una hora (Molés et al., 2011b). En este estudio, la inyección de esta scLh recombinante produjo los niveles más elevados de Lh en plasma entre los días 6 y 13 tras la primera inyección. A partir de entonces, debido a su eliminación metabólica, su presencia en el plasma se redujo drásticamente hasta niveles basales. En los tratamientos con el plásmido de scLh se observó una dinámica diferente. El tiempo requerido para la incorporación del plásmido por parte las células musculares y la subsiguiente síntesis y liberación de la proteína al torrente sanguíneo se tradujo en un aumento sostenido de Lh durante la primera semana después de la inyección, de manera que la primera subida significativa se dio el día 13. La secreción de la hormona por parte las células musculares inyectadas con plásmido se pudo detectar hasta 30 días después del tratamiento, a diferencia de los 13 días observados tras la administración de scLh, lo cual demuestra la conveniencia de este enfoque para tratamientos de larga duración. La producción sostenida de Lh por las células musculares de lubina concuerda con las observaciones descritas en mamíferos (revisado en Tonheim et al., 2008). La inyección de plásmidos codificantes de eritropoyetina (EPO) (Klinman et al., 1999) o

proteína alfa-1-antitripsina humana en ratones (Levy et al., 1995) generó un pico máximo de presencia de estas proteínas en el suero a los 7 días de la inyección; tras lo cual los niveles de proteína empezaron a decaer el día 14, y fueron prácticamente imperceptibles el día 21. También se han observado efectos de más larga duración, tales como la detección de niveles significativamente altos de EPO en plasma a los 90 y 140 días después de la inyección de ratones con un plásmido codificante de EPO (Tripathy et al., 1996; Gothelf et al., 2010). De hecho, la obtención de una expresión génica prolongada todavía es uno de los grandes objetivos de la terapia génica no viral. El diseño de la construcción de DNA o la forma de administración pueden influir en la eficiencia de este método, evidenciando que todavía existe margen para la mejora. Así por ejemplo, en mamíferos, la incorporación de secuencias intrónicas en los plásmidos aumentó drásticamente la duración de la expresión génica (Miao et al., 2000), y la inyección de un casete de expresión en forma de DNA lineal dio lugar a niveles de expresión entre 10 y 100 veces mayores que los generados por la inyección de un DNA circular equivalente en el hígado de ratones (Chen et al., 2001). En este sentido todavía es preciso llevar a cabo estudios adicionales en peces que permitan entender mejor el proceso de incorporación del DNA, y así posibilitar el diseño de plásmidos más efectivos, con niveles de expresión más altos y duraderos.

El tratamiento de machos de lubina adultos con pCMV-scLh o scLh dio lugar a un aumento en la producción de esperma, confirmando la bioactividad de esta hormona recombinante *in vivo* y fortaleciendo el papel de la Lh en la espermiación de esta especie. Nuestro grupo ya había demostrado con anterioridad que, en lubinas tratadas con GnRH α , se producía un aumento de la liberación de esperma paralelo al incremento de los niveles de la Lh en plasma (Mañanós et al., 2002), al igual que sucede en otras especies de peces (Swanson et al., 1991; Nagahama, 1994). De hecho, la inyección con pCMV-scLh generó niveles sostenidos de Lh similares a los obtenidos con implantes de liberación lenta de GnRH α (Mañanós et al., 2002), pues de manera similar, los peces tratados mostraron niveles de Lh en plasma más altos que los de los controles hasta el final del periodo de muestreo (34 días). Además en los peces tratados tanto con la scLh como con el plásmido, el volumen de esperma acumulado recogido fue más del doble que en los peces control. Los volúmenes de producción de esperma estaban en el mismo rango que los obtenidos previamente en los tratamientos con diferentes sistemas de liberación de GnRH α (Sorbera et al., 1996). Es de destacar que el aumento en el volumen de esperma liberado no alteró su calidad, en términos de densidad, que mostró valores similares a los obtenidos por Sorbera et al. Este es un aspecto de vital importancia a la hora de

planificar un método de inducción a la maduración. Puesto que la metodología usada en el presente trabajo es más directa en su acción que la basada en la utilización de GnRHa, nuestro enfoque puede ser muy adecuado para inducir la maduración de las gónadas y la puesta.

Contrariamente a los efectos de la scLh sobre la producción de esperma, los niveles en plasma de 11KT no incrementaron con el tratamiento con scLh. De hecho a medida que transcurría el experimento, con independencia del tratamiento, los valores iniciales de 11KT decayeron en todos los animales. Este perfil ciertamente concuerda con el observado por Mañanós et al en lubinas tratadas con distintos sistemas de liberación de GnRHa para inducir la espermiación, y afianza la idea de que este andrógeno no es importante en este proceso. No obstante, se ha demostrado previamente en lubina que la Lh es capaz de aumentar la producción de 11KT en testículos cultivados *in vitro* (Molés et al., 2011b). Esta discrepancia entre ambos estudios probablemente es un reflejo del estado de desarrollo testicular. Mientras que el tratamiento *in vitro* con Lh de testículos en estados tardíos de espermatogénesis estimuló la producción de 11KT, el de testículos en espermiación no fue capaz de incrementar la liberación de 11KT. La ausencia de un papel determinante de la 11KT sobre la espermiación de la lubina coincide con los resultados observados en otras especies (Borg et al., 1994).

A pesar de la gran cantidad de genes de peces aislados en los últimos años, hasta la fecha se han obtenido pocas proteínas recombinantes, principalmente por la complejidad que supone su producción. Por ello la investigación de sus funciones, regulación y aplicaciones biológicas en peces se ha ido demorando si se compara con los numerosos estudios sobre expresión génica. En cualquier caso, se han obtenidos resultados positivos en algunas especies de peces inyectados *in vivo* con gonadotrofinas recombinantes homólogas. Estos tratamientos influenciaron tanto a la producción de esteroides como al desarrollo de las gónadas (revisado en Levavi-Sivan et al., 2010). Como se ha demostrado en este capítulo, se puede considerar a la transferencia génica somática con vectores plasmídicos como una alternativa sencilla y de bajo coste al uso de hormonas recombinantes y nativas. Los vectores plasmídicos son fáciles de construir y su producción es fácil de escalar (Draghia-Akli et al., 2004). A ello se añade el hecho de que el DNA plasmídico se incorpora de forma eficaz a las células con una tasa de integración en su genoma desdeñable (Faure et al., 2010).

Tal como se demuestra en el presente capítulo, la transferencia somática de un DNA que codifica una gonadotrofina de cadena única se puede usar como terapia génica para resolver

disfunciones reproductivas asociadas a niveles bajos de hormonas. Además, la recuperación de los niveles hormonales iniciales, tres semanas después del tratamiento, sugiere que la administración repetida de plásmido codificante de gonadotrofina se puede usar como tratamiento de larga duración, en caso de deficiencias en gonadotrofina. En conclusión, comparando con la producción de hormonas recombinantes, y dado el bajo coste de la producción y la mayor persistencia del DNA plasmídico, este sistema muestra un gran potencial para la investigación *in vivo* y también como metodología de terapia génica para resolver disfunciones reproductivas o sincronizar el desove de especies cultivadas.

Capítulo 4:

El tratamiento *in vivo* con Fsh desencadena la espermatogénesis en el testículo de juveniles de lubina europea (*Dicentrarchus labrax*)

Publicado como: Mazón, MJ., Gómez, A., Yilmaz, O., Carrillo, M., Zanuy, S. 2014. Administration of Follicle-Stimulating Hormone *in vivo* Triggers Testicular Recrudescence of Juvenile European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **Biology of Reproduction**, **90** (1):6 1-10

Resumen

De manera general se asume, que la FSH actúa en las etapas tempranas de la espermatogénesis, sin embargo su función en peces aún no está definida claramente. En este capítulo se analizaron los efectos de la administración de una Fsh recombinante en la espermatogénesis de lubina empleando dos estrategias distintas: la inyección de una Fsh recombinante de cadena única (scFsh) y la inyección del DNA codificante de esa scFsh. Ambas estrategias incrementaron los niveles de Fsh en plasma, tras 7 y 15 días desde la primera inyección, respectivamente. El incremento de los niveles de Fsh generó, a su vez, un aumento significativo en los niveles de 11KT en plasma y provocó cambios importantes a nivel de testículo. Los grupos tratados con scFsh mostraron una proliferación mayor de las células germinales a día 7, así como una mayor presencia de cistes de espermatocitos y espermátidas al final del experimento. El tratamiento con Fsh provocó una disminución en el nivel de expresión del gen *amh* a día 7, y un incremento en la expresión de los genes de los receptores de Lh (*lhr*) y de Fsh (*fshr*) a 15 y 23 días, respectivamente. Estos resultados muestran que la Fsh inicia el proceso de proliferación de las células germinales y desencadena la espermatogénesis en lubina, estimulando la producción de andrógenos y regulando la expresión de genes vinculados a la espermatogénesis.

4.1. Introducción

La función de las gonadotrofinas en el proceso reproductivo de los peces se empieza a perfilar, aunque los roles específicos de la Fsh y la Lh aún no están definidos. De manera general se acepta que la Fsh actúa durante las etapas tempranas de la espermatogénesis, mientras que la Lh lo hace en los eventos finales de este proceso. En mamíferos resulta complicado delimitar los efectos específicos generados por la FSH o la LH en el desarrollo de las células germinales, ya que la acción final de ambas gonadotrofinas se ejerce sobre las células de Sertoli; la FSH lo hace mediante la estimulación de su propio receptor (FSHR) y la LH a través de la estimulación de la producción de andrógenos en las células de Leydig (Allan et al., 2004). En algunas especies de peces se ha demostrado recientemente que el gen *fshr* se expresa no sólo en las células de Sertoli, sino también en las de Leydig (García-López et al., 2008; Chauvigné et al., 2012). Por lo tanto, la Fsh podría estar actuando directamente sobre las células de Leydig, estimulando la producción de esteroides, al contrario de lo que se ha descrito en mamíferos.

En trabajos previos realizados en ratones se vio que en ausencia del FSHR las células de Sertoli no son capaces de incrementar su número (Abel et al., 2000). Esto tuvo como consecuencia que el número total de células germinales, así como el número de células germinales asociadas a las de Sertoli tampoco aumentaron; llevando finalmente a una disminución del tamaño del testículo y de la calidad del espermatozoide, aunque estos ratones permanecieron fértiles. Estos resultados ponen en evidencia que en mamíferos la FSH no es absolutamente imprescindible para el proceso de espermatogénesis. Además, la ausencia de FSH en machos de humanos y de ratas (Ruwampura et al., 2007) tampoco afectó a la proliferación de las células germinales, estando la FSH vinculada a la prevención de la apoptosis de las células germinales más que a promover su proliferación. Por otro lado, en el caso del tritón (*Cynops pyrrhogaster*), se ha descrito que la FSH es esencial para que tenga lugar la última mitosis de las espermatogonias (Yazawa et al., 2002). En peces, diversos estudios *in vivo* e *in vitro* (Ohta et al., 2007; Hayakawa et al., 2008; Kazeto et al., 2008; Kobayashi et al., 2010) apoyan la función proliferativa de la Fsh sobre las células espermatogoniales. Por ejemplo, en el caso de la anguila japonesa se ha conseguido inducir la espermatogénesis total *in vitro* tras el tratamiento con Fsh recombinante (Kazeto et al., 2008; Ohta et al., 2007) así como la producción de espermatozoides tras su aplicación *in vivo* a la anguila japonesa y el carpín dorado (Hayakawa et al., 2008; Kobayashi et al., 2010).

Ciertos experimentos realizados *in vitro* con anguila japonesa han demostrado que, en ausencia de Fsh, el tratamiento con 11KT puede estimular la espermatogénesis en su totalidad muy probablemente como consecuencia de la activación de las células de Sertoli (Ohta et al., 2007; Miura et al., 1991 a y b; Miura et al., 1996). Estos resultados sugieren que la función principal de la Fsh en la espermatogénesis de la anguila japonesa es la de estimular la producción de andrógenos (Miura et al., 1996). Por lo tanto no está todavía claro si la Fsh es una hormona esencial para la gametogénesis, o si por el contrario, su función se puede sustituir por la acción de las hormonas esteroideas.

Otros trabajos *in vitro* con pez cebra y en la anguila japonesa mostraron que la hormona Amh, cuya expresión está regulada por la Fsh, bloquea la espermatogénesis mediante la inhibición de la síntesis de andrógenos (Miura et al., 2002b; Skaar et al., 2011). En el presente capítulo se evaluó la acción de la Fsh *in vivo* sobre la expresión de *amh* y la síntesis de andrógenos.

En investigación relacionada con la reproducción se han empleado gonadotrofinas, tanto recombinantes como purificadas, en un amplio número de especies. Sin embargo, esta estrategia presenta la desventaja de que es preciso administrarlas en repetidas ocasiones debido a la rápida degradación que sufren. Además, la producción de proteínas recombinantes tiene varios inconvenientes tales como, la necesidad de producir cantidades elevadas de proteína, con las consiguientes modificaciones postraduccionales correctas que aseguren su funcionalidad y un sistema fácil de purificación de las mismas. En mamíferos, el uso de la transferencia génica somática usando vectores plasmídicos para administrar proteínas recombinantes es actualmente una alternativa real, debido a su simplicidad y su bajo coste (Ratanamart et al., 2006). En trabajos previos hemos demostrado, mediante inyecciones de DNA plasmídico en músculo esquelético de lubina, la habilidad que tiene este tejido para incorporar y expresar el gen inyectado (Muñoz et al., 2013). Es más, tal y como se ha descrito en el capítulo anterior la inyección de un plásmido que contenía la secuencia codificante de la Lh de lubina en forma de cadena única (scLh), resultó en la síntesis y liberación al torrente sanguíneo de esta Lh recombinante, teniendo además un efecto fisiológico sobre la producción de esperma en machos adultos de lubina.

Para conocer el posible papel de la Fsh en la estimulación de la espermatogénesis, en este capítulo se describe la inyección intramuscular de scFsh o su DNA codificante en machos juveniles de lubina. Una vez confirmado que se producía un incremento de los niveles de Fsh en plasma en los animales inyectados, se estudió su actividad *in vivo* evaluando el desarrollo

testicular, los niveles de 11KT en plasma y el cambio en la expresión de genes relacionados con el proceso de espermatogénesis. Se estudiaron los cambios de expresión de los genes de los receptores de gonadotrofinas *fshr* y *lhr* para determinar si la expresión del primero está regulada por la Fsh y si el segundo es un marcador de la espermatogénesis tardía. También se cuantificaron los niveles de expresión del gen *amh*, y del de la proteína 3 del complejo sinaptonémico (*scp3*), considerado como un marcador de la meiosis. Nuestros resultados muestran que el uso de un plásmido de expresión que codifica una Fsh de cadena única se podría usar como un método eficiente para estimular la recrudescencia gonadal, por lo que proponemos a esta metodología como un instrumento para investigar en reproducción y como una herramienta útil en acuicultura para paliar posibles disfunciones del stock de reproductores.

4.2. Material y métodos

4.2.1. Animales

Se utilizaron machos juveniles pre-púberes de lubina, de 10 meses de edad, (peso medio=66.8± 14,7g) adquiridos en Aquanord (Gravelines, Francia), se distribuyeron en 5 tanques circulares de fibra de vidrio de 500 l de capacidad y se alimentaron una vez al día con una dieta comercial. Los peces se pesaron y se marcaron (Fish Eagle PIT tag, USA) individualmente en la cavidad abdominal. El experimento se realizó durante los meses de noviembre y diciembre, bajo condiciones naturales de fotoperiodo (40°N; 0°E). Los cinco grupos experimentales se organizaron en dos grupos tratados con Fsh recombinante y tres grupos control. A los grupos tratados se les inyectó con a) una hormona Fsh recombinante de cadena única (grupo scFSH), o b) una construcción, pcDNA3-scFsh (grupo pscFSH), que contenía la secuencia codificante de la scFsh bajo el control del promotor CMV (Molés et al., 2011). Los grupos controles consistieron en un grupo no inyectado (grupo CONTROL), un grupo inyectado con un plásmido control (grupo pcDNA3) y un grupo inyectado con medio condicionado de células CHO sin transfectar (grupo CHO). Los últimos dos grupos sirvieron como control de los grupos pscFSH y scFSH, respectivamente. La temperatura del agua se mantuvo en condiciones naturales para los grupos scFSH y CHO (12-14°C), pero los grupos CONTROL, pcDNA3 y pscFSH se mantuvieron a 17°C para permitir la incorporación de los plásmidos en las células del músculo esquelético.

4.2.2. Producción de Fsh recombinante de lubina

La hormona recombinante scFsh se produjo empleando un clon estable de células CHO que contiene la construcción pcDNA3-scFsh (CHO-scFsh) (Molés et al., 2011b). La producción de la hormona se realizó siguiendo el protocolo de Schatz et al (2003). Las células CHO-scFsh se sembraron en frascos de 75cm² y se crecieron en medio DMEM (Invitrogen Corp), suplementado con 100U/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina y FBS al 5%, hasta alcanzar una confluencia del 80-90%. A continuación, el medio se sustituyó por DMEM sin FBS pero conservando la penicilina y la estreptomicina, y las células se mantuvieron en atmósfera húmeda con CO₂ al 5% y a 25°C durante 9 días. El medio de cultivo se recogió y se concentró mediante dispositivos de filtración de 30KDa (Centricon Plus-20, Millipore) y posteriormente se cuantificó. También se sembraron células CHO sin transfectar que se trataron igual que se ha descrito anteriormente para la producción de scFsh. El medio de cultivo de estas células se concentró y se inyectó al grupo CHO para controlar el efecto de los factores producidos por esta línea celular.

4.2.3. Inyecciones de los plásmidos y de la hormona

Los peces se inyectaron intramuscularmente a una profundidad de 4-5 mm en el músculo epaxial izquierdo anterior a la aleta dorsal, usando una jeringa de insulina y una aguja de calibre 26 ½ gauge. Antes del tratamiento se anestesiaron en fenoxietanol (0.5 ml/l). Los grupos pscFSH y pcDNA3 recibieron dos inyecciones, a días 0 y 3, con 75 µg/pez del plásmido diluido en PBS a un volumen final de 100 µl. Los plásmidos se prepararon usando resinas de intercambio aniónico de la marca Qiagen (Megaprep, Qiagen, Hilden, Germany). Con el fin de asegurar una correcta incorporación de los plásmidos los peces recibieron, inmediatamente después de la inyección del DNA plasmídico, 4 pulsos de electroporación de 90 V/cm y 20 ms de duración, aplicados en la zona de la inyección. Para ello se empleó un electrodo con forma de doble aguja (BTX 2-Needle Array Model 531) y el electroporador ECM830 (BTX). Los grupos scFSH y CHO también se inyectaron los días 0 y 3. El grupo scFSH recibió 0.5 µg de scFsh (equivalente a 27 µl del medio concentrado de scFsh) en un volumen final de 100 µl de PBS, mientras que el grupo control recibió 20 µl del medio condicionado CHO en un volumen final de 100 µl de PBS. El día de la primera inyección se sacrificaron y muestrearon siete animales que se emplearon como punto inicial del experimento. Los peces se sacrificaron siguiendo la legislación española (Real Decreto Act 53/2013) y europea (2010/63EU) concerniente a la protección de animales de

experimentación. El protocolo empleado para su sacrificio fue aprobado por el Comité de Bienestar animal del IATS (Número de Registro 09-0201) y supervisado por el Ministerio de Medio Rural y Marino.

4.2.4. Muestreos

El experimento tuvo una duración de 15 días para los grupos tratados con la hormona recombinante (scFSH y CHO) y de 23 días para los grupos inyectados con DNA (pscFSH y pcDNA3) y el grupo CONTROL. Lo observado previamente en los tratamientos con scLh (Capítulo 3, Mazón et al., 2013), nos llevó a asumir que en los animales inyectados con el plásmido la scFsh producida tardaría más tiempo en estar disponible en el torrente sanguíneo que en los inyectados directamente con la hormona, por ello el experimento se prolongó una semana más en los animales tratados con el DNA plasmídico. Los peces se muestrearon semanalmente. Tras anestesiarnos en fenoxietanol (0,5 ml/l) se les extrajo sangre a través de la vena caudal y se obtuvo el plasma mediante centrifugación (2500xg, 30 min, 4°C) y ésta se conservó a -20°C hasta el análisis hormonal posterior. Transcurridos 7, 15 y 23 días desde la primera inyección, se sacrificaron diez ejemplares por grupo y se extrajeron sus gónadas. Para detectar la proliferación celular en las gónadas mediante inmunohistoquímica, los animales se inyectaron intraperitonealmente (i.p) dos horas antes del sacrificio con 50 mg/kg de peso corporal de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, Sigma, St Louis MO). Una alícuota de las gónadas se fijó en paraformaldehído 4%/glutaraldehído 1% en solución salina (McDowell y Trump, 1976) para su estudio histológico o en paraformaldehído al 4% con 10% de ácido pícrico para su análisis inmunohistoquímico. La segunda alícuota se conservó a -80°C para la extracción de RNA.

4.2.5. Análisis hormonal

Los niveles de Fsh en el plasma se determinaron mediante un bioensayo basado en la línea celular HEK-293, previamente descrito en (Molés et al., 2011a). Brevemente, células del clon estable de HEK-293 sbsFSHR/pCRE-LUC se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano y paredes blancas (Corning) y se trataron las células durante 7 horas con el plasma de los peces diluido 1:25 veces en Advanced-DMEM. Tras eliminar el medio y el plasma, se midieron los niveles de actividad luciferasa directamente en las placas de cultivo mediante el kit Tropix LUC-Screen (AppliedBiosystems, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando la plataforma de detección ULTRA Evolution (TECAN). La actividad luciferasa se expresó como unidades relativas de luz (RLU). El mismo bioensayo se empleó

para calibrar y medir la actividad del medio concentrado de scFsh, usando cantidades conocidas de Fsh nativa de lubina como curva estándar. Los niveles de 11KT se midieron mediante EIA según (Rodríguez et al., 2005).

4.2.6. Aislamiento de RNA y transcripción reversa para ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El RNA total del tejido congelado se extrajo empleando Tri-Reagent (Molecular Research Center) siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del RNA así como su pureza y concentración se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa y midiendo su absorbancia a 260/280 nm (GeneQuant, PharmaciaBiotech, Cambridge, England). La síntesis de cDNA se realizó con la transcriptasa inversa SuperScript II (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) utilizando como sustrato 1 µg de RNA con 100 ng de hexámeros como cebadores, y siguiendo las instrucciones del fabricante.

La expresión génica se cuantificó mediante PCR en tiempo real, usando ese cDNA como molde. Todas las muestras se analizaron por triplicado en placas ópticas de 96 pocillos y empleando los reactivos QPCR Mix ABgene's Absolute™ (Fisher). Las amplificaciones y lecturas se realizaron en una máquina iCycler iQ™ (BioRad Laboratories, Inc). Para cada reacción de PCR de 25 µl se empleó 1 µl de cDNA y la correspondiente cantidad de cebadores y sonda Taqman, excepto para el análisis del rRNA *18S* que se empleó una dilución 1:10 de cDNA. Se prepararon curvas estándar para los genes de interés así como para el gen endógeno de referencia, *18s*, usando una dilución seriada de los plásmidos que contenían cada gen. Los coeficientes de correlación de las curvas estándar variaron entre 0.99 y 1.00, con una eficiencia de las PCR de entre 89-97%. La cuantificación de los genes *fshr*, *lhr*, *amh* y el gen de referencia *18s* se realizó según lo descrito en Rocha et al (2009) y Crespo et al (2013).

Se amplificó un fragmento del cDNA del gen *scp3* mediante PCR usando 1 µl de cDNA de testículo y los cebadores específicos de *scp3* Fw (5'-AACTCCGATAGTGGAAAAGTTGG-3') y Rv (5'-AACAGGCTAGAACAGCATGGAC-3'), cuya secuencia se obtuvo de una base de datos que contiene el genoma de lubina (Kuhl & Reinhardt, sin publicar). Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización a 94°C durante 2min, 20 ciclos de 94°C durante 30s, 66°C durante 30s, con una reducción de 0.5°C por ciclo, lo cual resultó en una reducción final de 10°C y una extensión a 72°C durante 30 s, seguido de 20 ciclos de 94°C durante 30s, 56°C durante 30s y una extensión a 72°C durante 30 s. La extensión final consistió en un único

ciclo de 72°C durante 5 min. El producto de PCR se insertó en el plásmido pGEM-T Easy Vector (Promega Corp.) y se secuenció. La secuencia del cDNA se verificó contrastándola con la secuencia de la base de datos del genoma de lubina y está accesible en GenBank con el número de acceso JQ824128. Los cebadores y la sonda TaqMan de *scp3* se diseñaron empleando el software Primer Express (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) y sus secuencias y concentraciones empleadas fueron las siguientes: cebador *scp3* 301 fw: GGAGGAGGAGCTCAACAATCTG (900 nM), cebador *scp3* 377 rv: GCTTCTGGTTCTGGACCACTCT (300 nM), sonda *scp3* 324 pr: [6~FAM]TCAGACAGCAGCAAAAGATCCTGCAGC[TAMRA](50 nM), con un producto de 77 pb de tamaño y una eficiencia en la PCR de 0.96. Los valores se analizaron empleando el software iCycler iQ™ (versión 3.0.6070). Para cada muestra la cantidad de transcritos del gen se determinó a partir de su respectiva curva estándar. Los datos se representaron como niveles relativos de mRNA normalizado con el rRNA *18s*.

4.2.7. Estudio histológico del testículo y tinción inmunohistoquímica

Las gónadas fijadas se deshidrataron en una batería de alcoholes de 70-96%. Las gónadas fijadas en formaldehído 4% / glutaraldehído 1% (McDowell y Trump, 1976) se incluyeron en resina de metacrilato (Technovit 7100; Heraeus, Kulzer, Germany). Las secciones de 4 µm se colorearon con azul de metileno/azure II/ fucsina básica para analizar individualmente tanto el estado reproductivo como otros parámetros histológicos. Las muestras fijadas en paraformaldehído 4% / ácido pícrico 10% se incluyeron en parafina (Paraplast Plus, Thermolectron, Waltham, MA) y se cortaron a 5 µm. Las secciones se desparafinaron y rehidrataron para detectar la incorporación de BrdU mediante inmunohistoquímica siguiendo el protocolo descrito en (Chaves-Pozo et al., 2007). Brevemente, las secciones se incubaron con H₂O₂ (Merck) en metanol (Panreac) a una relación de 1:9 durante 40 min. Después se lavaron en solución Coon (barbiturato sódico 0.01M y NaCl 0.1M, ph 7.4) y en solución Coon's con BSA 0.01% y Triton X-100 2% (CBT). Tras 30 min de incubación en ácido periódico a 60°C, las muestras se bloquearon durante 20 min en BSA al 5% (Sigma) en PBS (pH 7.4). Después se incubaron durante 2 h, a temperatura ambiente, con el anticuerpo monoclonal anti-BrdU (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) diluido 1:500 en CBT. Las muestras se lavaron dos veces en CBT y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa (Sigma) a una dilución 1:1000 en CBT durante 1 h a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron en CBT y en Tris-HCl (pH 7.6) 0.05M durante 5 min. La actividad peroxidasa se reveló mediante incubación con 3-3' diaminobenzidina (Sigma) en

solución Tris-HCl con H_2O_2 al 0.05% durante aproximadamente 5 min a temperatura ambiente. Las muestras se tiñeron con hematoxilina de Mayer. Como control negativo de la reacción se emplearon muestras en las que se omitió la incubación con el anticuerpo primario.

4.2.8. Evaluaciones histológicas

Para determinar el número de células en proliferación y de células germinales, se estudiaron diez animales por grupo y por punto de muestreo. En cada pez se analizaron 30 áreas ópticas a una magnitud de $\times 100$. Las áreas analizadas se distribuyeron aleatoriamente para cubrir la totalidad de la sección del testículo. Las células germinales se caracterizaron y clasificaron de acuerdo a lo descrito previamente en (Begtashi et al., 2004). En base a su morfología y a la distribución de la heterocromatina, las células germinales se clasificaron como: espermatogonia A temprana (StgA), espermatogonia A tardía (StgA₁) y espermatogonia tipo B (StgB). Las StgA son las de mayor tamaño, con un diámetro de $12.6 \pm 0.2 \mu m$ y presentan un ratio citoplasma/núcleo elevado. Tienen una forma redondeada con un núcleo grande y esférico y con heterocromatina densa alrededor de la membrana nuclear (Fig. 4.4A y 4.4C). Las StgA₁ son de menor tamaño que las StgA (diámetro de $9 \pm 0.08 \mu m$) pero de morfología similar, con la heterocromatina a nivel de la membrana nuclear y un núcleo eucromático (Fig. 4.4A, 4.4B, 4.4C y 4.4D). Las diferentes generaciones de espermatogonias B (StgB con diámetro variable entre $6.8 \pm 0.06 \mu m$ y $3.96 \pm 0.05 \mu m$) se agrupan en cistes (Fig. 4.4B y 4.4D). Estos incrementan en tamaño a medida que progresa la espermatogénesis, mientras que el tamaño del núcleo, la densidad de las células y el ratio citoplasma/núcleo disminuye. Aunque no se contabilizaron también se observó la presencia de cistes de espermatocitos tipo I (Fig. 4.4D) en fase de leptonema-zigonema (tamaño diametral $3.91 \pm 0.03 \mu m$), paquinema (diámetro $4.18 \pm 0.03 \mu m$) y diplonema (diámetro $3.91 \pm 0.03 \mu m$), espermatocitos II (diámetro $3.28 \pm 0.03 \mu m$) (Fig. 4.4D) y espermátidas (Fig. 4.4D). También se determinó el número de células de Sertoli en proliferación 15 días después de la primera inyección.

4.2.9. Análisis estadístico

El número de células germinales se calculó como el porcentaje de células de un tipo concreto respecto al total de células contadas en el área considerada. Los valores de porcentaje se transformaron y analizaron con una ANOVA de dos vías con un análisis posterior de Holm-Sidak. La proliferación se calculó como el número medio de células en proliferación en 30 campos ópticos a una magnitud de $\times 100$. Los datos se representan como media $\pm$ SEM. El número de células de Sertoli en proliferación (BrdU⁺) se analizó mediante ANOVA de una

vía seguido del test Student-Newman-Keuls con un nivel de significancia de $p < 0.001$. Los controles de proliferación de células germinales (BrdU⁺) se analizaron mediante ANOVA de una vía y los valores se agruparon tras confirmar que no existían diferencias significativas entre ellos. Los valores agrupados de los grupos control se compararon con sus respectivos grupos experimentales usando un test no-paramétrico Mann-Whitney Rank Sum con un nivel de significancia de $p < 0.05$. Los niveles plasmáticos de Fsh y 11KT y los niveles de expresión de los genes *lhr*, *amh*, *fshr* y *scp3* se representaron como la media $\pm$ SEM. Los valores se analizaron tras su transformación logarítmica, mediante ANOVA de dos vías seguido de un análisis de Holm-Sidak con un nivel de significación de $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa Sigma Stat versión 3.0 (SYSTAT Software Inc., Richmond, CA).

4.3. Resultados

4.3.1. Niveles plasmáticos de Fsh y 11KT

Las inyecciones intramusculares de scFsh dieron lugar a un incremento significativo de los niveles plasmáticos de Fsh (Fig. 4.1). Transcurridos tres días desde la primera inyección, los niveles de Fsh eran 4 veces más elevados que los del control, y permanecieron significativamente altos hasta el día 7, regresando a los valores de los controles el día 15. Los niveles de Fsh en el grupo pscFSH aumentaron de manera continua desde el día 0 hasta alcanzar su pico más alto 15 días después de la primera inyección. El día 23, los niveles de Fsh todavía eran significativamente mayores que los de los grupos CONTROL y pcDNA3. En los grupos CONTROL, pcDNA3 o CHO, no se detectaron cambios significativos en los niveles plasmáticos de Fsh a lo largo del experimento.

Con el fin de determinar el efecto que tiene el incremento de Fsh circulante sobre la producción de esteroides, se analizaron los niveles de 11KT en plasma. El grupo scFSH presentó un pico de 11KT 3 días después de la primera inyección (Fig. 4.2) que fue significativamente diferente de los valores observados en el resto de grupos experimentales y controles. A los 7 días tras la primera inyección los niveles de 11KT decayeron, pero aún eran significativamente más elevados que los observados a día 0 y los de los grupos control. En el grupo pscFSH, los niveles de 11KT en plasma aumentaron de manera continua desde el día 3, y en comparación con los grupos control alcanzaron su pico en los días 7 y 15. No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos 23 días después de la primera

inyección. Los grupos CHO, CONTROL y pcDNA3 mostraron niveles basales de 11KT a lo largo de todo el experimento.

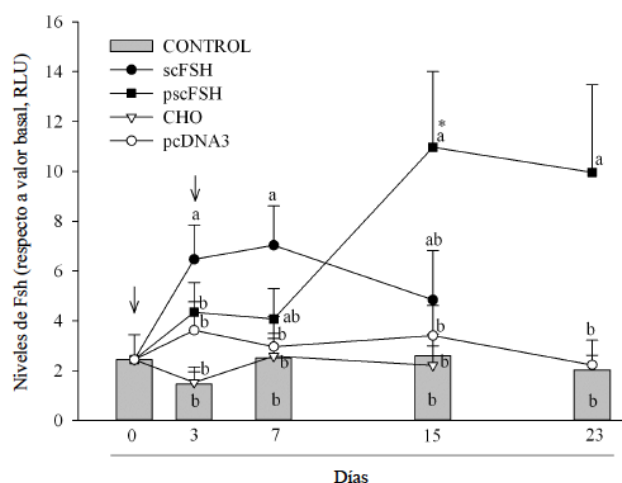


Figura 4.1. Niveles relativos de Fsh en plasma. Los niveles hormonales se midieron como actividad luciferasa (RLU) empleando un bioensayo basado en un cultivo celular. Los valores se representaron como una cantidad relativa respecto a los niveles basales. El valor medio de RLU de cinco animales muestreados a día 0 se consideró como nivel basal y se le dio valor 1. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para el mismo punto de muestreo. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas con respecto a los días 3 y 7. Las flechas marcan los días en los que se administraron las inyecciones. Los datos se han representado como media±SEM de cada grupo y punto de muestreo; ($P<0.05$, Holm-Sidak).

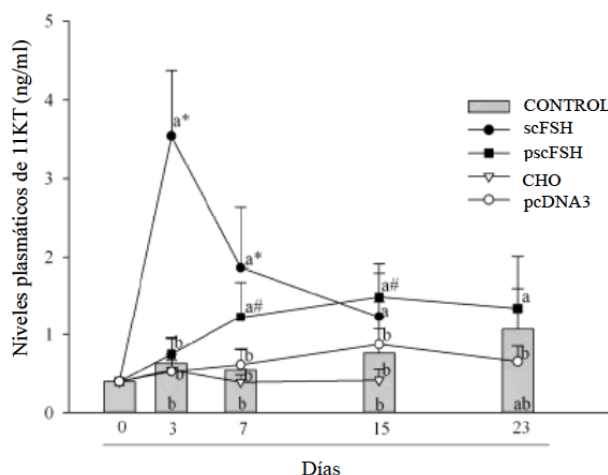


Figura 4.2. Niveles plasmáticos de 11KT (ng/ml). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos para un mismo punto de muestreo. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al día 0. El símbolo (#) indica diferencias significativas respecto al día 3. Los datos se han representado como media±SEM de cada grupo y punto de muestreo; ($P<0.05$, Holm-Sidak).

4.3.2. Efecto *in vivo* de la Fsh recombinante sobre la espermatogénesis

Con el fin de evaluar los efectos de la Fsh recombinante sobre la espermatogénesis, se contó el número de espermatogonias StgA, StgA₁ y StgB (Fig. 4.3). Siete días después de la primera inyección no se detectaron diferencias significativas entre los grupos en el porcentaje de StgA y StgA₁ (Fig. 4.3A y 4.3B). En los controles sólo se observó la presencia de StgA y StgA₁ a lo largo del periodo experimental, con la excepción de un pequeño porcentaje de StgB detectado en el grupo CONTROL a día 15 (Fig. 4.3A, 4.3B 4.3C). Conforme avanzó el experimento, el porcentaje de StgA se redujo en los grupos scFSH y pscFSH. Así que, el porcentaje de StgA observado a día 15 en el grupo scFSH y en los días 15 y 23 en el grupo pscFSH fue significativamente inferior a los valores de estos mismos grupos a día 0 y a los valores presentados por los grupos control (Fig. 4.3A e inserto). En el caso del grupo pscFSH se observó un incremento progresivo del número de StgA₁ a partir del día 7, alcanzando su nivel más alto el día 23 que fue significativamente distinto del de los grupos control (Fig. 4.3B). El grupo scFSH también mostró un incremento gradual de las StgA₁ hasta día 15, pero no fue significativamente diferente del de los grupos control (Fig. 4.3B). Transcurridos 7 días desde la primera inyección, en el grupo scFSH se detectó un pequeño incremento en el porcentaje de las StgB (Fig. 4.3C). El porcentaje de las StgB en el grupo scFSH a los 15 días, y en el grupo pscFSH a los 15 y 23 días fue significativamente más alto que en los respectivos controles (Fig. 4.3D). Además, los grupos tratados con Fsh mostraron estadios testiculares más desarrollados con presencia de StgB el día 15 (Fig. 4.4B) y cistes de espermatocitos en estado I y II, y de espermátidas el día 23 (Fig. 4.4D). En los grupos control sólo se observó la presencia de StgA y StgA₁ (Fig. 4.4A y 4.4C).

El efecto de los tratamientos con Fsh sobre la proliferación de las células germinales se evaluó midiendo la incorporación de BrdU (Fig. 4.5). Los dos tratamientos con Fsh generaron un incremento significativo en la proliferación de las células germinales. El tratamiento con pscFSH incrementó de manera significativa los porcentajes de StgA, StgA₁ y StgB BrdU positivas. En el grupo scFSH también se observó un aumento significativo de StgA y StgA₁ proliferativas. En los grupos control no se observaron cambios en el número de células BrdU positivas. Ambos tratamientos con scFsh generaron a su vez un incremento en el número de células de Sertoli en proliferación transcurridos 15 días desde la primera inyección.

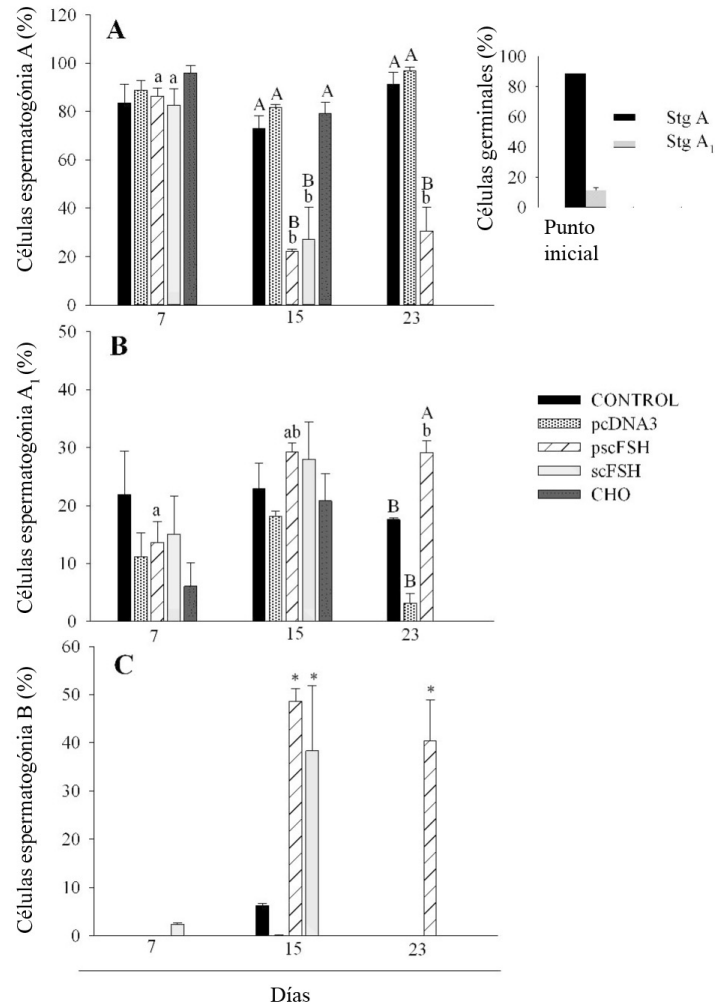


Figura 4.3. Porcentajes de células germinales (StgA, StgA₁ y StgB) contadas en 943 mm². Los datos se han representado como media±SEM de (n=10) peces/punto de muestreo ($P<0.05$), test de Tukey. Las letras en mayúsculas indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo punto de muestreo. Las letras en minúsculas indican diferencias significativas a lo largo del experimento para un mismo grupo. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto a los otros grupos para un mismo punto de muestreo. El inserto representa el porcentaje de StgA y StgA₁ en el punto inicial del experimento.

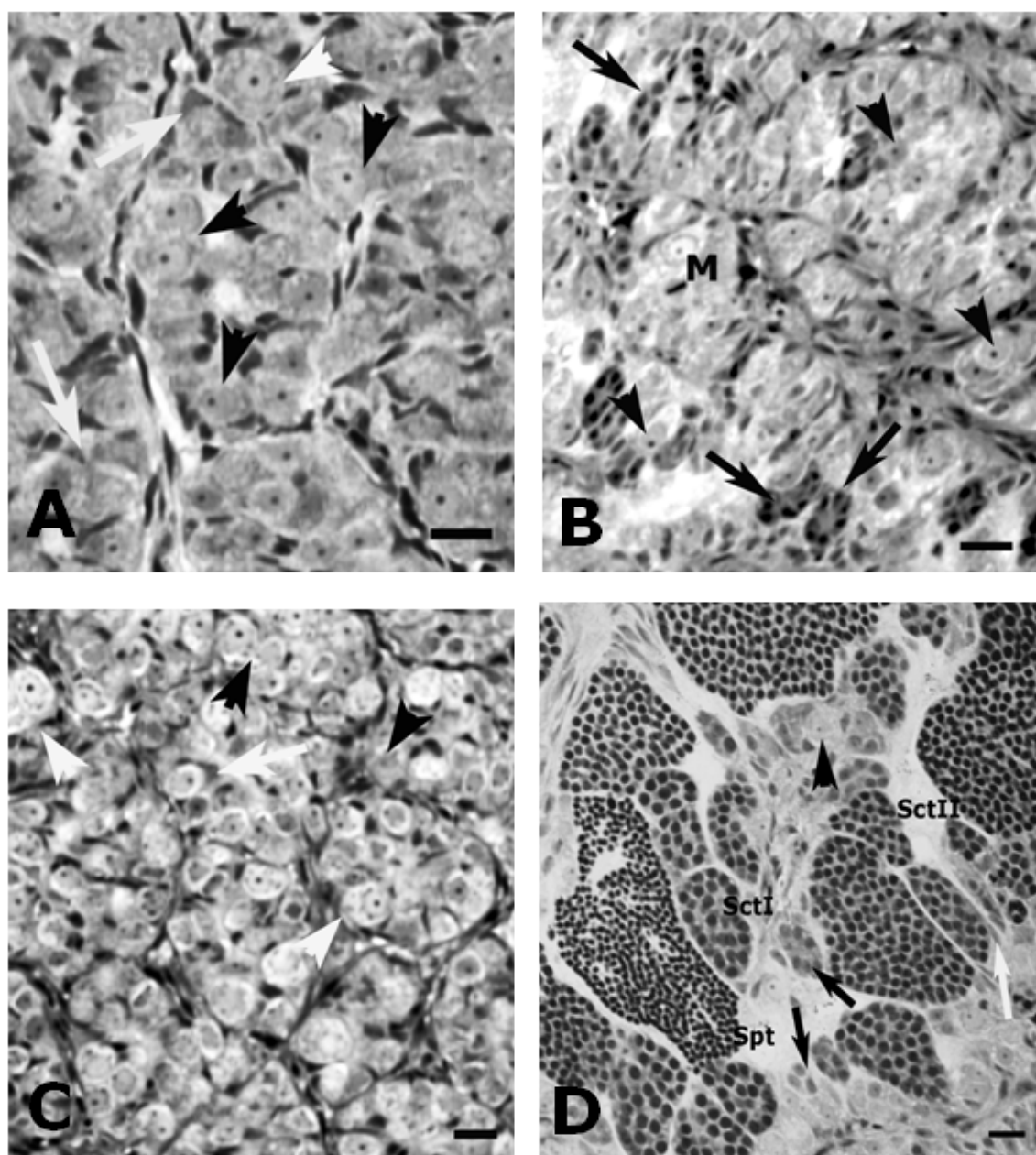


Figura 4.4. Efecto *in vivo* de la Fsh recombinante sobre la espermatogénesis de lubina. En los grupos control, tanto CHO (A) como pcDNA3 (C), sólo se observaron células de tipo StgA (cabeza de flecha blanca) y StgA₁ (cabeza de flecha negra) los días 15 (A) y 23 (C) tras la primera inyección, respectivamente. También se detectaron células de Sertoli (flechas blancas) rodeando ambos tipos de espermatogonias A. En el grupo scFSH (B) a los 15 días de la primera inyección se observaron abundantes cistes de espermatogonias B (flechas negras). Además se observaron numerosas mitosis (M). En el grupo pscFSH (D) a día 23 tras la primera inyección había abundantes cistes de espermatocitos de tipo I y II (SctI y SctII) así como de espermatídas (Spt). La barra de escala representa 10 μ m.

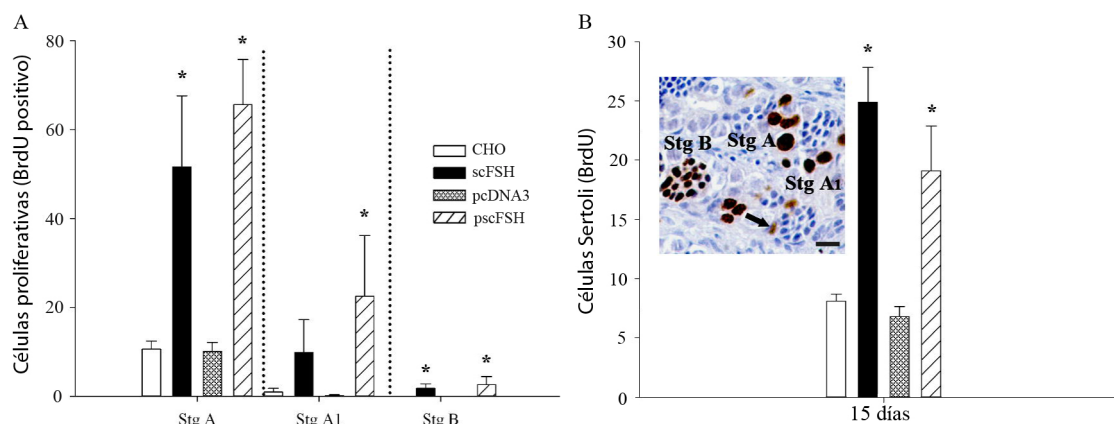


Figura 4.5. (A) Número de células proliferativas (BrdU⁺). Los datos se representan como media±SEM de (n=10) peces/punto de muestreo; a día 15 tras la inyección para los grupos scFSH y CHO, y a día 23 para los grupos pscFSH y pcDNA3. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al grupo control para cada tipo celular ($P<0.01$). **(B)** Número de células de Sertoli proliferativas (BrdU⁺) 15 días después de la primera inyección. Los datos se representan como media±SEM de (n=10) peces/punto de muestreo. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al grupo control ($P<0.05$). La fotografía insertada muestra una visión al microscopio después de la tinción del BrdU. Mayer hematoxilina. La barra de escala representa 10 μ m.

4.3.3. Efecto de la Fsh en la expresión de genes involucrados en la espermatogénesis

En primer lugar aislamos un fragmento de 570 pb del cDNA de *scp3*. Tras comparar su secuencia con aquellas contenidas en la base de datos GenBank se confirmó que este cDNA correspondía al gen *scp3* de lubina. Scp3 es un componente del complejo sinaptonémico axial/lateral que se expresa en espermatocitos (Yano et al., 2008) y por lo tanto es un marcador de este tipo celular germinal.

Los cambios en la expresión de los genes *fshr*, *lhr*, *amh* y *scp3* se analizaron mediante PCR en tiempo real (Fig. 4.6). La expresión del gen *fshr* no varió en el grupo CONTROL (Fig. 4.6A). En los grupos scFSH y CHO la expresión de este gen disminuyó el día 15 con respecto al resto de grupos, aunque no fue significativamente diferente del punto inicial. Los mayores niveles de expresión del *fshr* se obtuvieron en el grupo pscFSH. En estos animales, la expresión de este gen fue significativamente superior a partir del día 7, en comparación con el punto inicial, alcanzando la expresión más alta el día 23. En los grupos tratados con Fsh los niveles del mRNA del *lhr* (Fig. 4.6B) incrementaron cuando la recrudescencia gonadal fue

evidente desde un punto de vista morfológico. A los 15 días de la primera inyección, la expresión del *lhr* en los animales del grupo pscFSH incrementó significativamente respecto al resto de grupos y al punto inicial. Estas diferencias significativas se mantuvieron hasta el día 23. En el caso del grupo scFSH, los niveles de expresión del *lhr* también aumentaron, pero no se observaron diferencias significativas en comparación con el punto inicial y con los grupos control los días 7 o 15. No se observaron cambios significativos en los grupos CONTROL, CHO y pcDNA3 a lo largo del experimento.

Los niveles de expresión del gen *amh* se redujeron considerablemente 7 días después del tratamiento con pscFSH (Fig. 4.6C). En este grupo los niveles de expresión fueron significativamente menores que los obtenidos en los otros grupos o en el punto inicial. El día 15 los niveles de expresión de *amh* en el grupo pscFSH eran similares a los de los grupos control, pero 23 días después de la primera inyección, la expresión de *amh* nuevamente se redujo de manera significativa en este grupo respecto a su propio control. La expresión de *amh* observada en el grupo scFSH a día 7 fue significativamente menor que la de su grupo control CHO, y permaneció baja hasta el día 15.

No se vieron cambios significativos en la expresión de *scp3* a lo largo del experimento entre los grupos pcDNA3, CONTROL y CHO, ni tampoco en el grupo scFSH. Sin embargo el grupo pscFSH presentó un ligero incremento, aunque no significativo, el día 15, y mostró un pico máximo de expresión el día 23 que fue significativamente superior a los niveles presentados por los grupos control y su propio nivel basal (Fig. 4.6D).

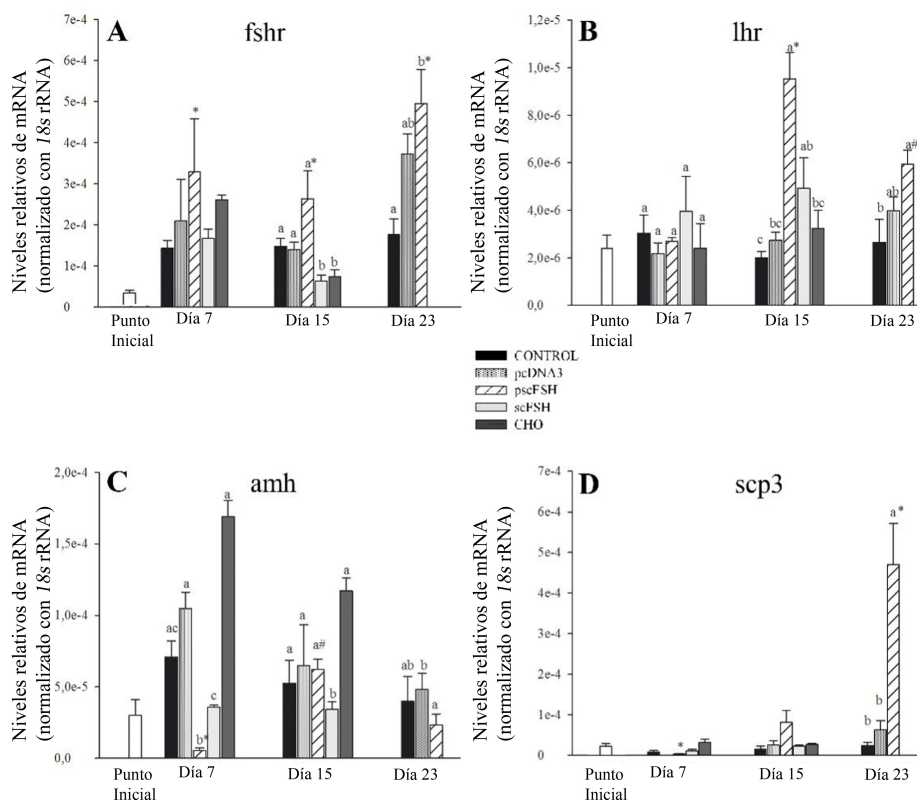


Figura 4.6. (A) Cambios relativos en la expresión de *fshr*. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al punto inicial ($P < 0.005$). (B) Cambios relativos en la expresión de *lhr*. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al día 7 y al punto inicial ($P < 0.005$) y el símbolo # indica diferencias significativas respecto al punto inicial ($P < 0.005$). (C) Cambios relativos en la expresión de *amh*. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre los puntos de muestreo ($P < 0.005$) y el símbolo # indica diferencias significativas respecto al día 23 ($P < 0.005$). (D) Cambios relativos en la expresión de *scp3*. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas respecto al punto inicial ($P < 0.005$), y las letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos experimentales para un mismo punto de muestreo ($P < 0.005$). La expresión se normalizó frente al rRNA *18S* y se expresó como un valor proporcional al valor medio del grupo CONTROL a día 7.

4.4. Discusión

En el capítulo 3 hemos mostrado que la transferencia génica somática es un método para inducir la espermiogénesis en la lubina, al generar Lh adicional a la procedente de la hipófisis. En este capítulo se ha empleado la misma estrategia, junto con la administración de la scFsh recombinante, para determinar si la acción de esta gonadotrofina puede iniciar el proceso de espermatogénesis en machos pre-púberes de lubina.

Las inyecciones con scFsh o pcDNA3-scFsh incrementaron clara y significativamente los

niveles plasmáticos de Fsh, independientemente del sistema de administración empleado, aunque de manera diferencial. Los tratamientos con scFsh generaron una respuesta aguda seguida de una eliminación rápida de la hormona del torrente sanguíneo, mientras que el incremento generado por el plásmido pcDNA3-scFsh fue más progresivo y duradero en el tiempo. Este comportamiento diferente derivó en consecuencias también diferentes, ya que en el grupo scFSH se detectó un incremento rápido en los niveles de 11KT, pero en el grupo pscFSH este incremento fue más suave. Esta respuesta en los niveles de 11KT indica que en los machos de lubina la esteroidogénesis, derivada de la actividad de la Fsh, estimula las etapas tempranas de la espermatogénesis, como sugirieron Molés et al (2008).

En estudios recientes desarrollados en anguila japonesa, pez gato africano, pez cebra y lenguado se ha descrito que el receptor de Fsh se expresa tanto en células de Sertoli como en células de Leydig (Ohta et al., 2007; García-López et al., 2010; Chauvigné et al., 2012). Los resultados presentados en este capítulo sugieren que la Fsh actuaría sobre las células de Leydig induciendo probablemente la producción y liberación de andrógenos. Se ha especulado que el aumento de los niveles plasmáticos de Fsh observado al inicio de la proliferación de las espermatogonias podría estar relacionado con la proliferación de las células de Sertoli (Loir, 1999), cuyo incremento está asociado a la expansión mitótica de los cistes de espermatogonias (Schulz et al., 2012). En el presente estudio se detectó, mediante inmunohistoquímica con BrdU, que el tratamiento con Fsh recombinante daba lugar a un incremento significativo en el número de células de Sertoli. Las inyecciones con scFsh o pcDNA3-scFsh a su vez, generaron un aumento en el número de StgA, StgB y de cistes de espermatocitos y espermátidas, de manera que el perfil de proliferación celular de los grupos experimentales era semejante al perfil de los niveles de Fsh en plasma. Por otro lado, los grupos control permanecieron en un estado quiescente, mostrando sólo StgA y StgA₁. Estos resultados apoyan de manera rotunda que en la lubina la Fsh y la proliferación de las células de Sertoli y germinales están relacionadas. Algo similar se ha sugerido en la trucha arcoíris (Loir, 1999) y en pez gato africano hemigonadectomizado (Schulz et al., 2012) y a su vez, confirma que la Fsh actúa como un estimulador temprano de la espermatogénesis. Adicionalmente, en el grupo pscFSH se detectó un incremento en la expresión de *scp3* a día 23. Este gen se ha utilizado como marcador de espermatocitos en medaka (Iwai et al., 2006), trucha arcoíris (Yano et al., 2008) y pez cebra (Leal et al., 2009); por lo que estos resultados demuestran que los animales del grupo pscFSH entraron en proceso de meiosis y refuerzan el papel de la Fsh como una señal iniciadora de la espermatogénesis. Por el contrario, en el

grupo scFSH no se observaron diferencias transcurridos 15 días desde la primera inyección. Es probable que los niveles de Fsh alcanzados fueran suficientes para promover la proliferación de las espermatogonias pero no para entrar en meiosis. La acción de la Fsh sobre la proliferación también se ha descrito en otras especies de vertebrados. En el caso de ratones deficientes en gonadotrofinas (Singh y Handelsman, 1996; Abel et al., 2009), el tratamiento con Fsh incrementó el número de espermatogonias y espermatoцитos. En embriones de pollo, Méndez y colaboradores (1998 y 2003) también detectaron que tras su exposición a FSH humana se incrementó la proliferación tanto de células somáticas, como de las células germinales en sus gónadas. De manera similar Allan et al (2004) describieron que en ratones con una deficiencia en Lh la administración de Fsh estimulaba la proliferación de células de Sertoli. Sin embargo existe cierta controversia sobre si esta actividad proliferativa es exclusivamente debida a la Fsh. De hecho, existen algunos trabajos en los que se muestra que la Fsh es prescindible, ya que los andrógenos pueden suplir su función (Abel et al., 2000; Singh et al., 1995; Haywood et al., 2003). En anguila japonesa, Ohta y colaboradores (2007) demostraron que la Fsh inicia la espermatogénesis estimulando la producción de 11KT. De hecho, en presencia de trilostano, un inhibidor de la 3β -Hsd, la producción de 11KT se bloqueaba y como consecuencia se inhibía la progresión de la espermatogénesis. De manera similar, en el pez cebra la Fsh estimuló la expresión de genes esteroideogénicos en células de Leydig y la liberación de 11KT, lo cual indicó su participación en el avance de la espermatogénesis (Skaar et al., 2011). En ambos casos se ha confirmado la presencia del Fshr en las células de Leydig (Ohta et al., 2007; García-López et al., 2010), por lo que lo más probable es que la ruta usada por la Fsh para promover la espermatogénesis incluya la activación de estas células para sintetizar 11KT. Así pues la presencia de ambas hormonas provocaría la proliferación de las células de Sertoli y la de las células germinales asociadas a ellas.

Se acepta de manera general que en peces el *fshr* se expresa principalmente en las células de Sertoli. En la lubina la expresión de este gen aumenta durante el crecimiento del testículo (Rocha et al., 2009), probablemente debido, en parte, a la proliferación de las células de Sertoli. A medida que progresa la espermatogénesis hay una expansión del volumen de los cistes, por lo que el número de células de Sertoli queda diluido y por lo tanto se observa un descenso en los transcritos del *fshr* (Schulz et al., 2005). En este capítulo, no se observa un patrón de expresión claro para este receptor, a día 15 en el grupo scFSH se detecta una reducción significativa, mientras que en el grupo pscFSH se observa un aumento, también

significativo. Estos resultados son difíciles de interpretar dado que la información que existe respecto a la regulación transcripcional del *fshr* es escasa. Tanto en peces como en mamíferos hay pocos argumentos que sostengan la opción de que sea la propia Fsh quien regule la expresión de su receptor. En el caso de las ratas, la hipofisectomía seguida de un tratamiento con Fsh (Maguire et al., 1997) mostró que la Fsh es capaz de disminuir la expresión del *Fshr*. De igual manera la estimulación de células de Sertoli de ratón (Viswanathan et al., 2009) con Fsh generó una reducción en los niveles de expresión del *Fshr* durante las 6-12 primeras horas de tratamiento *in vitro*, pero los niveles posteriormente se recuperaron. De acuerdo con estos resultados, se puede especular que el incremento en los niveles de expresión del *fshr* detectado en el grupo pscFSH se podría deber a un aumento gradual de la Fsh en plasma, contrariamente a lo observado en el grupo scFSH, donde el aumento fue más agudo.

En la lubina la Lh está asociada a las fases finales de maduración y ovulación/espermiación (Rocha et al., 2009; Molés et al., 2011a) y es en ese momento cuando se han observado los niveles de expresión más altos del *lhr* en el testículo (Rocha et al., 2009). Por lo tanto, es probable que la Fsh tenga una acción dual: promover la proliferación celular y la esteroidogénesis y preparar el testículo para la acción de la Lh. Odell y colaboradores (1973 y 1974) sugirieron que la respuesta del testículo a la Lh se alcanza de manera progresiva y que es consecuencia de una exposición previa, durante su etapa inmadura, a la Fsh. Los resultados de este trabajo coinciden con esa hipótesis, de hecho los transcritos de *lhr* se incrementaron 15 días después de la primera inyección con Fsh, cuando los testículos presentaban un estado más avanzado de maduración. Cabe destacar que este incremento fue más evidente en el grupo pscFSH que en el scFSH, lo cual puede que se deba a que la transcripción del *lhr* requiera un aumento de los niveles de Fsh estable y sostenido más que un aumento puntual y agudo. En la lubina se ha descrito que durante la espermatogénesis incrementan los niveles de transcripción de *lhβ* en la hipófisis, alcanzando valores máximos en la espermiación (Mateos et al., 2003), lo cual coincide con el perfil de Lh en plasma (Rocha et al., 2009). Debido a que en el presente experimento el tamaño de la muestra de plasma era limitado, no se pudieron medir los niveles de Lh, por lo que en futuros estudios sería interesante evaluar si la Fsh recombinante es capaz que incrementar la síntesis de Lh, tal y como se ha observado con los transcritos de *lhr*.

Las células de Sertoli son las únicas células somáticas presentes en los cistes y su población determina el número de células germinales, ya que proporcionan los factores de crecimiento necesarios para que la espermatogénesis se desarrolle con éxito (Schulz et al., 2005 y 2010).

En peces, se dispone de cierta información acerca de cómo los andrógenos y estrógenos controlan la expresión génica de esos factores, sin embargo hay muy poca información acerca de cómo la regula la Fsh. La Amh, también denominada factor (MIF) o sustancia (MIS) inhibidora Mülleriana, es uno de esos factores cuya expresión tiene que reprimirse para que el inicio de la maduración gonadal tenga lugar (Miura et al., 2002b). En mamíferos macho esta glicoproteína es responsable de la regresión de los conductos de Müller (Cate et al., 1986; Picard et al., 1986). A pesar de que los peces no tienen estos conductos, se han clonado cDNAs con secuencias similares al *amh* en una gran variedad de especies de peces como la anguila japonesa (Miura et al., 2002b), el lenguado japonés (Yoshinaga et al., 2004), el pez cebra (Rodríguez-Marí et al., 2005), el salmón del atlántico (Maugars y Schmitz, 2008), la lubina (Halm et al., 2007), el pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) (Fernandino et al., 2008), la trucha arcoíris (Baron et al., 2003) y la tilapia (Poonlaphdecha et al., 2011). En este capítulo se muestra cómo los niveles de expresión de *amh* en lubina cambian durante el proceso de espermatogénesis inducido por el tratamiento con Fsh. Tras administrar Fsh, los niveles de 11KT aumentaron, coincidiendo con una disminución significativa en los niveles de expresión de *amh*. Este descenso fue agudo en el grupo pscFSH y más modesto, pero aún significativo, en el grupo scFSH. Esta inhibición fue en paralelo con el incremento en la proliferación celular.

Se han realizado experimentos *in vitro* con Amh recombinante en anguila japonesa (Miura et al., 2002b) y en pez cebra (Skaar et al., 2011) que sugieren que su acción inhibidora de la espermatogénesis se ejerce mediante el bloqueo de la síntesis de 11KT. En mamíferos se ha descrito que, en el momento de la pubertad, se produce un incremento de los niveles de testosterona en el testículo, lo que genera una inhibición de la Amh (Al-Attar et al., 1997), y en ratones transgénicos se ha detectado hiperplasia de las células de Leydig tras la inactivación de *Amh* (Behringer et al., 1994). Todo esto destaca el papel de la Amh en el control de la diferenciación de las células de Leydig y en la síntesis de andrógenos. Por otro lado, ratones transgénicos que sobre-expresan *Amh* presentan un bloqueo en la diferenciación de los precursores de las células de Leydig y en la expresión de genes codificantes de proteínas esteroideogénicas (di Clemente et al., 1994; Racine et al., 1998; Josso et al., 1998). Estos resultados sugieren que existe una relación entre los andrógenos y la expresión de *Amh*.

En peces, Miura y colaboradores (2002b) propusieron que la inhibición de la expresión de *mis* es consecuencia del incremento de los niveles de 11KT. En el pez cebra (Skaar et al., 2011) se ha descrito que la Amh suprime la expresión génica de enzimas esteroideogénicas (*star* y

cyp17a1); por lo tanto, al igual que sucede en el testículo de mamíferos durante su periodo fetal (Teixeira et al., 1999), la *Amh* suprime la síntesis de andrógenos en las células de Leydig, y la expresión de *Amh* debe bloquearse para que incrementen los niveles de andrógenos. Al inicio de la espermatogénesis, la Fsh activa la proliferación de las células de Sertoli tanto en mamíferos (Sharpe et al., 2003) como en peces (Schulz et al., 2005 y este capítulo), probablemente esto viene acompañado por la supresión de la síntesis de *Amh*, ya que se ha descrito que la *Amh* inhibe el crecimiento y diferenciación de las células tanto en mamíferos (Segev et al., 2000; Durlinger et al., 2001) como en peces (Skaar et al., 2011). Los resultados presentados en este capítulo sugieren que una etapa muy temprana en la espermatogénesis de la lubina sería la activación de las células de Sertoli a través del estímulo de la Fsh, lo que derivaría en la represión de la expresión de *amh*, que junto a la acción de la Fsh tendría como consecuencia la estimulación de las células de Leydig, y finalmente el incremento de los niveles de 11KT. Sin embargo, hacen falta más estudios para determinar si la supresión de la expresión de *amh* por parte de la Fsh es consecuencia de su acción directa sobre las células de Sertoli, o es consecuencia de su efecto esteroideogénico, mediante la activación de las células de Leydig.

En resumen, en este capítulo se demuestra que la Fsh es capaz de activar el proceso de espermatogénesis en machos pre-púberes de lubina, promoviendo la proliferación de las espermatogonias hasta su entrada en meiosis. Esta actividad incluye la reducción de la expresión de *amh* y la preparación de la gónada para la acción de la Lh mediante el incremento en la expresión del *lhr*. Finalmente, concluir que el aislamiento y clonación de un cDNA o de un gen de interés en un vector de expresión es una técnica más rápida, fácil y barata que la producción de su correspondiente proteína recombinante. Queda demostrado que la administración y expresión *in vivo* de genes codificantes de hormonas puede ser una metodología de gran interés y utilidad para la investigación en endocrinología reproductiva, además de una herramienta potente en acuicultura capaz de solventar disfunciones reproductivas importantes del stock de parentales.

Capítulo 5:

La Fsh, y no la Lh, inicia la espermatogénesis en lubina (*Dicentrarchus labrax*) estimulando la proliferación y diferenciación de las células germinales

Manuscrito en preparación: María José Mazón, Silvia Zanuy, Ana Gómez

Resumen

La reproducción en peces está dirigida por las gonadotrofinas hipofisarias, Fsh y Lh. El papel específico de cada una de ellas en la maduración de los testículos todavía no está establecido, pero se cree que la Fsh actuaría en las etapas tempranas de la espermatogénesis, mientras que la Lh participaría en los eventos finales. En el capítulo anterior hemos demostrado que el tratamiento de machos de lubina con Fsh promueve la proliferación de las espermatogonias y su diferenciación en espermatocitos primarios. En este capítulo se analiza el efecto de la administración, independiente o secuencial, de Fsh y Lh sobre el crecimiento del testículo de lubina. Para ello se administraron plásmidos que contenían los cDNAs codificantes de la Fsh y la Lh y se evaluó su efecto sobre la morfología testicular, los niveles plasmáticos de hormonas y la expresión de genes gonadales. Treinta y seis días después de la primera inyección los grupos tratados con Fsh mostraron un porcentaje mayor de individuos con cistes de espermatocitos en los testículos, mientras que los grupos control y tratados con Lh permanecieron inmaduros. El tratamiento con Fsh también dio lugar a un incremento de la expresión de marcadores de células germinales como *piwi*, *pcna* y *scp3*. Por el contrario la Lh sola incrementó la expresión de genes de enzimas esteroideogénicas como *cyp17a1* y *cyp17a2*. Estos resultados permiten concluir que la Fsh es la señal iniciadora de la espermatogénesis en lubina, mientras que la Lh potencia la acción de la Fsh permitiendo el progreso de la espermatogénesis.

5.1. Introducción

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación celular complejo y bien regulado en el que una espermatogonia indiferenciada prolifera y se diferencia para producir esperma. Este proceso está orquestado por una amplia variedad de factores paracrinicos y endocrinos, entre los cuales las gonadotrofinas (Fsh y Lh) juegan un papel esencial. En la lubina, como en la mayoría de los peces teleósteos, el rol específico de cada gonadotrofina no está definido claramente. La falta de precisión en la descripción de la acción de cada hormona en peces es consecuencia de la escasez de herramientas para su estudio, como por ejemplo métodos para determinar sus niveles en plasma. Recientemente se ha desarrollado un ELISA específico para la Fsh de lubina (Molés et al., 2012) que constituye una herramienta valiosa para estudiar la función concreta de esta hormona en la espermatogénesis. Considerando los niveles plasmáticos de Fsh (Molés et al., 2012) y de Lh (Rocha et al., 2009), se puede asumir que en el macho de lubina la Fsh actúa durante las etapas tempranas de la espermatogénesis y la Lh en las tardías, es decir en la maduración del esperma y la espermiación. En el capítulo anterior se ha descrito que la administración de una Fsh recombinante a machos inmaduros de lubina (Mazón et al., 2014) induce la proliferación y diferenciación de las espermatogonias en espermatoцитos, al igual que sucede en mamíferos (Abel et al., 2000; Allan et al., 2004; Méndez et al., 2003; Singh y Handelsman, 1996) y en la anguila japonesa (Kamei et al., 2006; Ohta et al., 2007; Yukinori et al., 2008). Además, en los animales tratados la Fsh generó un incremento en los niveles de 11KT en plasma y una reducción en la expresión de *amh*. De acuerdo con estos resultados se podría especular que la Fsh tiene un efecto directo sobre las células de Sertoli, suprimiendo la expresión de *amh* y permitiendo la proliferación celular. Además, la Fsh activaría de forma directa o indirecta a las células de Leydig para iniciar el proceso de esteroidogénesis, ya que este tipo celular es responsable de la síntesis de esteroides. En algunas especies de peces se ha descrito la presencia del receptor de Fsh en las células de Leydig (García-López et al., 2008; Ohta et al., 2007). Si esta misma situación se diera en la lubina, la actividad esteroidogénica de la Fsh, observada tanto *in vitro* (Molés et al., 2008 y 2011b) como *in vivo* (Capítulo 4, Mazón et al., 2014), sería consecuencia de la acción directa de esta hormona sobre las células de Leydig, a través del Fshr. Sin embargo la presencia de este receptor en las células de Leydig de lubina aún está por determinar.

Los esteroides juegan un papel esencial no solo durante el inicio de la espermatogénesis, si no también durante la maduración del espermatozoide y en el proceso de espermiación (Schulz et al., 2010). La Fsh estimula la producción de 11KT durante la espermatogénesis, esencial para la proliferación y/o diferenciación de las espermatogonias (Capítulo 4, Mazón et al., 2014; Miura y Miura, 2011; Schulz et al., 2010). La Lh incrementa la síntesis de la MIH, hormona inductora de la maduración, como por ejemplo la 17 α ,20 α -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP) o la 17 α ,20 α ,21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona, esteroides esenciales para la maduración del espermatozoide (Mylonas et al., 2010). Los esteroides derivan del colesterol, el cual se transporta al interior de la mitocondria con la ayuda de la proteína StAR, y tras la acción de diferentes enzimas esteroidogénicas, como la aromatasa o Cyp19a1a, el citocromo P450c17A1 o Cyp17a1 y la 3 β Hsd, entre otras, se transforma en diferentes esteroides sexuales. Durante el crecimiento gonadal la producción de estas enzimas está regulada por la Fsh y la Lh en función de la necesidad del tipo de esteroides. Esta regulación, probablemente, es consecuencia de los distintos niveles de expresión de los receptores de gonadotropinas a lo largo de los diferentes estados de desarrollo testicular (Kusakabe et al., 2006).

Las células de Sertoli son el único tipo de células somáticas presentes en los cistes testiculares, y su función es proporcionar los factores necesarios para que las células germinales vivan y proliferen (Griswold, 1998). Estas células expresan el *fshr*, por lo que lo más probable es que la Fsh influya sobre las principales funciones de las células germinales (Abel et al., 2000). Además, las células de Sertoli producen una serie de factores de crecimiento que actúan de una forma paracrina sobre las células germinales. Entre ellos están los factores de crecimiento similares a insulina (IGF1 e IGF2), que juegan un papel importante en el control de la proliferación de las espermatogonias (Loir y LeGac, 1994). Existe un tercer tipo de IGF, aislado recientemente en peces, el Igfb/Igf3, que parece ser específico de los teleósteos y que solo se expresa en las gónadas (Wang et al., 2008). Este factor está regulado específicamente por la acción de la Fsh (Sambroni et al., 2013) y está implicado en la maduración de los oocitos (Li et al., 2011). Otros factores paracrinicos implicados en la espermatogénesis son los receptores del factor de crecimiento epidérmico (Egfr) y sus numerosos ligandos, que controlan la división celular, diferenciación, supervivencia, motilidad y apoptosis (Jorissen et al., 2003). En varias especies de peces se ha identificado una duplicación génica del *egfr* y se han clonado los genes de dos receptores distintos denominados *egfra* y *egfrb* (Gómez et al., 2004; Laisney et al., 2010) aunque todavía no se ha determinado su función en la espermatogénesis. A su vez se ha observado que

diversos miembros de esta familia de péptidos participan activamente en la gametogénesis; por ejemplo el Egf estimula la proliferación de espermatogonias en mamíferos (Abe et al., 2008; Caussanel et al., 1996; Kassab et al., 2007), y el Egf y el Tgf- β favorecen la maduración de los oocitos en el pez cebra (Wang y Ge, 2004).

Haciendo uso del método de terapia hormonal mediante administración de plásmidos, ya validado para lubina (ver capítulos 3 y 4), en este capítulo se estudió el efecto de la administración de Fsh y/o Lh recombinantes sobre el inicio y progreso de la espermatogénesis a través de los cambios en la morfología testicular, en los niveles plasmáticos de 11KT y en el perfil de expresión génica de marcadores de células germinales, enzimas esteroideogénicas y factores paracrinós.

5.2. Material y métodos

5.2.1. Animales

Para estos experimentos se utilizaron machos inmaduros de lubina europea de 12 meses de edad (peso medio=281 $\pm$ 34,4g), obtenidos en Aquanord (Gravelines, Francia). Estos se distribuyeron en cuatro tanques circulares de fibra de vidrio de 500 l de capacidad. Los animales se alimentaron *ad libitum* una vez al día con dieta comercial (Proaqua Nutrición, S.A, Palencia). Al inicio del experimento los peces se pesaron y se marcaron individualmente en la cavidad abdominal (Fish Eagle PIT tag, USA). El experimento se llevó a cabo durante los meses de Febrero y Marzo, en condiciones naturales de fotoperiodo (40°N, 0°E). Los peces se organizaron en cuatro grupos denominados: pcDNA3 (inyectados con el plásmido control pcDNA3), pscFSH (inyectados con el plásmido pcDNA3-scFsh), pscLH (inyectados con el plásmido pcDNA3-scLh; también denominado pCMV-scLh) y pscFSH/pscLH (inyectados con ambas construcciones). La temperatura del agua se mantuvo a 17°C.

5.2.2. Producción e inyección de los plásmidos

El DNA plasmídico se obtuvo tal y como se describe en el capítulo 3. Se crecieron en medio LB dos clones de *E. coli* DH5 α conteniendo los plásmidos pcDNA-scFsh o pcDNA3-scLh (Molés et al., 2011b), posteriormente el DNA se purificó mediante columnas de cromatografía de intercambio aniónico (Megapreps, Qiagen Inc., Chatswoth, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las inyecciones de los plásmidos y la subsiguiente electroporación se realizaron en el músculo epaxial izquierdo anterior a la aleta dorsal, como se describe en el capítulo 4. Los peces se inyectaron con 100 µg/pez de plásmido diluido en un volumen final de 100 µl de PBS. El grupo pscFSH recibió dos inyecciones de pcDNA3-scFsh los días 0 y 3. El grupo pscLH recibió dos inyecciones de pcDNA3-scLh los días 14 y 17. El grupo pscFSH/pscLH recibió cuatro inyecciones, dos de pcDNA3-scFsh los días 0 y 3, y dos de pcDNA3-scLH los días 14 y 17, de manera similar el grupo pcDNA3 se inyectó con el plásmido control en los mismos cuatro días.

Todos los experimentos se realizaron siguiendo la legislación española (Real Decreto Act 53/2013) y europea (2010/63EU) concerniente a la protección de animales de experimentación. El protocolo empleado para su sacrificio fue aprobado por el Comité de Bienestar animal del IATS (Número de Registro 09-0201) y supervisado por el Ministerio de Medio Rural y Marino.

5.2.3. Muestreos

Los peces se muestrearon semanalmente tras anestesia en fenoxietanol (0.5 ml/l). La sangre se obtuvo mediante punción caudal los días 0, 3, 7, 14, 17, 22, 29 y 36 después de la primera inyección, se extrajo el plasma mediante centrifugación (2500xg, 30 min, 4°C) y se conservó a -20°C hasta el análisis de las hormonas. El grupo pscFSH no se pudo muestrear el día 17 debido a problemas técnicos con ese tanque experimental. El día de la primera inyección se muestrearon diez animales no inyectados que sirvieron como punto inicial. Los días 15, 22, 29 y 36 tras la primera inyección, se sacrificaron quince animales por grupo y se extrajeron las gónadas de las que se hicieron dos alícuotas, una se fijó en paraformaldehído al 4%: glutaraldehído 1% (McDowell y Trump, 1976) para su estudio histológico y la otra se almacenó a -80°C para extraer RNA.

5.2.4. Análisis hormonal

Los niveles de Fsh en plasma se determinaron mediante un ELISA específico para lubina (Molés et al. 2012) con una sensibilidad de 0.5 ng/ml (Bi/Bo=45%) y un coeficiente de variación intra- e inter-ensayo de 2.12% (n=10) y 5.44% (n=16), respectivamente. Los niveles plasmáticos de Lh se determinaron mediante un ELISA específico para lubina (Mateos et al., 2006) con un límite de detección de 0.65 pg/ml (Bi/Bo=80%) y unos coeficientes de variación intra- e inter-ensayo de 11.7% (n=8) y 11% (n=10), respectivamente. Los niveles de 11KT se

analizaron mediante EIA según Rodríguez et al. (2005). La sensibilidad del ensayo fue de 0.0012 ng/ml (Bi/Bo=90%).

5.2.5. Histología

Las muestras de gónada fijadas en paraformaldehído 4%: glutaraldehído 1% en tampón fosfato se deshidrataron en una serie de alcoholes 70-96% y se incluyeron en resina de metacrilato (Technovit 7100, Heraeus, Kulzer, Alemania). Se realizaron secciones de 4 µm y se tiñeron con azul metileno/azur II/ fucsina básica (Bennet et al., 1976) para determinar el estado de desarrollo testicular individual, según Begtashi et al. (2004), y para analizar otros parámetros histológicos.

5.2.6. Aislamiento de cDNAs de lubina

Mediante amplificación por PCR se obtuvieron fragmentos de los siguientes cDNAs de lubina: *egfra* y *egfrb*, *igfb1/igf3*, *btc*, *3βhsd*, *cyp17a1* y *cyp17a2*, y *piwi*. Como moldes se utilizaron cDNAs de testículo de lubina, y se emplearon cebadores específicos (Tabla 5.1) cuyas secuencias se dedujeron del genoma de la lubina (Kuhl & Reinhardt, sin publicar). Las condiciones de las PCRs fueron: un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguido de 20 ciclos de 94°C / 30 s, 66°C / 30 s (con una reducción (*touchdown*) de 0.5°C por ciclo, lo que generó una reducción final de 10°C), y una extensión a 72°C de 30 s. A continuación se realizaron un máximo de 20 ciclos con las mismas condiciones pero usando como temperatura fija de anillamiento la mínima alcanzada en la fase de *touchdown*. La extensión final de la PCR fue un ciclo único de 5 min a 72°C. Los productos de PCR se introdujeron en el vector pGEM-T Easy (Promega Corp) y se secuenciaron. La exactitud de las secuencias se comparó con la secuencia del genoma de la lubina y están disponibles en GenBank con los siguientes números de acceso *egfra*, JQ755302; *egfrb*, JQ824127; *igf3*, JQ861950; *btc*, JQ861951; *3βhsd*, JQ861952; *cyp17a1*, JQ861953; *cyp17a2*, JQ861954; *piwi*, JQ861955.

Tabla 5.1. Lista de cebadores

Gen	Secuencia cebador (5'-3')	Tamaño producto	No. Acceso GenBank
<i>egfra</i>	Fw ATGACACCCCTCTCTCACCCA Rv ACAGTTTTGAGCACCAGATGCC	650pb	JQ755302
<i>egfrb</i>	Fw ATGAGTAACCAGCTGACGCTGT Rv CTTGGCTTTGGGATTGTTGACC	780pb	JQ824127
<i>igfb1/igf3</i>	Fw CCGCTCTCCTCAGAAGC Rv TTCAAAGCTCATCACTCTTTG	480pb	JQ861950
<i>cyp17a1</i>	Fw GGAGCTCTGTGCATGTTT Rv AGTCATGAGGAGGTGGTC	500pb	JQ861953
<i>cyp17a2</i>	Fw CAGGAGCGCGTGACAGAAG Rv CGCCCTCGGAGTGACAAC	480pb	JQ861953
<i>3βhsd</i>	Fw ATGTCGGACACACAGCGGGG Rv GGGTTATCCAGAGGGAAGTGT	1000pb	JQ861952
<i>piwi</i>	Fw CTGAAAGACTATCTGAAGTTC Rv GAGGAGGTCGTCCAGTTTCAT	470pb	JQ861955
<i>btc</i>	Fw ATGATTGTCTTTTTGTTGTGTTT Rv TACAGCATTGGTGTGTGGTG	550pb	JQ861951

5.2.7. Aislamiento de RNA y transcripción reversa para ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El RNA total del tejido congelado se extrajo empleando Tri-Reagent (Molecular Research Center) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los RNAs se reconstituyeron en 20 μ l de agua estéril tratada con DEPC y se guardaron a -80°C hasta que se analizaron. La integridad del RNA así como su pureza y concentración se determinaron mediante electroforesis en gel de agarosa y midiendo su absorbancia a 260/280 nm (Nanodrop, ThermoScientific.). La síntesis de cDNA se realizó usando la transcriptasa inversa SuperScript III (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) utilizando 2 μ g de RNA como molde, 50 ng de hexámeros como cebadores y dNTPs a 10mM, en un volumen total de 20 μ l. Las muestras se calentaron a 65°C durante 10 min. Después de enfriar brevemente en hielo, se añadió una mezcla que contenía tampón de reacción 5X, DTT 0.1M y 1 μ l de Superscript III. Las muestras se incubaron a 25°C durante 5 min y a 50°C durante 60 min. La reacción se paró calentando a 70°C durante 15 min.

Los cebadores y sondas TaqMan para la qPCR de *cyp17a1*, *cyp17a2*, *3βhsd*, *ar*, *egfra*, *egfrb*, *igf3*, y *btc* se diseñaron usando el programa Primer Express (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). La cuantificación de la expresión de los genes *fshr*, *lhr* (Rocha et al., 2009), *scp3* (Capítulo 4, Mazón et al., 2014), *amh* y *pcna* (*proliferating cell nuclear antigen*) (Crespo et al., 2013) se realizó como se describe en las referencias correspondientes, y se indica también en la Tabla 5.2. Como gen de referencia se usó el gen de la proteína ribosomal L-13 (*l-13*), empleando los cebadores y la reacción validada por Mitter et al (2009). Para cada 25 µl de reacción de qPCR se usó 1 µl de cDNA y las correspondientes cantidades de sondas y cebadores (Tabla 5.2). Todas las muestras se analizaron por triplicado usando una máquina de PCR en tiempo real Mastercycler ® Realplex (Eppendorf, Inc.) en placas ópticas de 96 pocillos y empleando la mezcla de reacción Abgene's Absolute™ QPCR (Fisher). Las curvas estándar para los genes de interés, así como para el gen endógeno de referencia se prepararon usando una dilución seriada de plásmidos que contenían cada uno de los genes. Los coeficientes de correlación de las curvas estándar variaron entre 0.99 y 1.00. Para cada muestra la cantidad de gen transcrito se determinó a partir de su respectiva curva estándar. Los niveles de expresión de *l-13* se normalizaron siguiendo la fórmula propuesta por Billiau et al. (2001) y Essex-Fraser (2005): *valor individual dentro del grupo/(valor medio del grupo/valor medio del grupo control)*, donde el grupo pcDNA3 a día 15 se eligió como *grupo control*. Esto permite el uso de un control interno que considera los errores derivados de la reacción de RT y de la carga de la muestra. La expresión génica se normalizó posteriormente con los valores ajustados de *l-13*. Los datos se representaron como niveles relativos de mRNA

Tabla 5.2. Lista de cebadores y sondas TaqMan™.

Gen	Cebador o sonda	Secuencia (5'-3')	nM ^a	Tamaño del amplicón; Eficiencia de la PCR ^b
<i>ar</i>	Fw	CGGCTGAGGAAGTGTGTTTGAA	300	74 pb; 1.07
	Rv	GTTTTTCTGTTGTCCAATCTTCTTTAGTT	300	
	Pr	[6-FAM] CCGGAATGACTCTCGGAGCACGC [TAMRA]	300	
<i>cyp17a1</i>	Fw	GCCGTCACCAATGTCATCTG	300	77 pb; 0.94
	Rv	CAGCATGGCCTCGAACTCA	50	
	Pr	[6-FAM] TCACTGTGCTTCAACTCGTCCTACCGC [TAMRA]	125	
<i>cyp17a2</i>	Fw	CACCACGACCCCCAACTCT	300	66 pb; 0.99
	Rv	GGTCGTCAAGGAAACGATCTG	300	
	Pr	[6-FAM] ACGCACCCGACCTGTTCAACCC [TAMRA]	75	
<i>3βhsd</i>	Fw	AGGTGAAGGGTGGACAGTGTTT	75	66 pb; 0.97
	Rv	TGGCCCTCGCCATAGATC	75	
	Pr	[6-FAM] CACACATGCTCTCTGAGGCCGACG [TAMRA]	50	
<i>piwi</i>	Fw	CGTCTCCCCGACCCACTAC	50	70 pb; 0.99
	Rv	TGAGCCGCTGCATGTGAT	50	
	Pr	[6-FAM] TGTACGACACCAGCGGACTGAAGCC [TAMRA]	175	
<i>egfra</i>	Fw	CCCAGGATTCTCTGGAGAAC	900	76 pb; 0.95
	Rv	ATCACAGCAAGAGCAAACCTTTCC	900	
	Pr	[6-FAM] CGCATCATTCGTGGTCATTCGCTCT [TAMRA]	225	
<i>egfrb</i>	Fw	GCTCTGCTGGTGATGTCCAA	200	70 pb; 0.98
	Rv	TTCAGGCCGCTGGTGTAGTT	200	
	Pr	[6-FAM] ACAACAGAAACCACTCGTCTGCAACCT [TAMRA]	200	
<i>btc</i>	Fw	AAGAACCAAGGAATGGGACTGA	900	76 pb; 1.05
	Rv	TGAGTCTTCCGTTAAAGGTGTGTGT	900	
<i>igf3</i>	Fw	CACAATCTTCACGTCGACAGAAA	300	74 pb; 1.0
	Rv	TGCTAGTTGCGTTCTGTTTGTTT	900	
	Pr	[6-FAM] CGAAGTTTCATCATCACGCCGGAAG [TAMRA]	150	

^aCantidad de cebador o sonda en la reacción de qPCR. ^bValor medio de tres ensayos.

5.2.8. Estadística

Los niveles plasmáticos de Fsh, Lh y 11KT, así como los niveles de expresión génica se representaron como media $\pm$ SEM. Los datos se transformaron a logaritmos y se analizaron con un ANOVA de 2 vías seguido de un análisis de Holm-Sidak con un nivel de significación de $p<0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa Sigma Stat versión 3.0 (SYSTAT Software Inc., Richmond, CA).

5.3. Resultados

5.3.1. Niveles plasmáticos de Fsh, Lh y 11KT

Para evaluar la acción de la Fsh y la Lh sobre la activación de la espermatogénesis en machos inmaduros de lubina, se trataron dos grupos de animales con cada uno de los plásmidos codificantes de esas hormonas, pcDNA3-scFsh (grupo pscFSH) o pcDNA3-scLh (grupo pscLH) de manera independiente. En los machos adultos de lubina, los niveles más elevados de Lh en plasma se observan durante la espermiación (Rocha et al., 2009), mientras que los niveles mas altos de Fsh se observan durante las etapas tempranas de la espermatogénesis (Molés et al., 2012). Con la finalidad de reproducir este perfil, se trató otro grupo de animales con inyecciones consecutivas de pcDNA3-scFsh y pcDNA3-scLh (grupo pscFSH/pscLH). El cuarto grupo experimental consistió en animales inyectados con un plásmido control (grupo pcDNA3).

Las inyecciones intramusculares con pcDNA3-scFsh ocasionaron cambios importantes en los niveles plasmáticos de Fsh (Fig. 5.1A). Siete días después de la primera inyección los niveles de Fsh en los grupos pscFSH y pscFSH/pscLH eran tres veces más elevados que en el grupo control. En el grupo pscFSH la Fsh plasmática permaneció significativamente más elevada que en el control hasta el día 29 y hasta el 36 en el grupo pscFSH/pscLH. No se observaron cambios significativos en los niveles de esta hormona en los grupos pcDNA3 y pscLH.

En los grupos pscLH y pscFSH/pscLH, las inyecciones con pcDNA3-scLh dieron lugar a un incremento significativo de los niveles de Lh en sangre respecto a los grupos pcDNA3 y pscFSH (Fig. 5.1B). En el grupo pscLH estas diferencias significativas se observaron a partir del día 17 y en el grupo pscFSH/pscLH a partir del día 22, y permanecieron así hasta el final del experimento. En los grupos pcDNA3 y pscFSH no se detectaron cambios relevantes en los niveles plasmáticos de Lh.

Para determinar el efecto de la Fsh y la Lh sobre la producción de esteroides se determinaron los niveles de 11KT en plasma (Fig. 5.1C). Tan sólo se observaron cambios significativos en los animales del grupo pscFSH/pscLH. En este grupo los niveles plasmáticos de 11KT incrementaron de manera progresiva desde el día 7 hasta alcanzar niveles significativamente elevados 17, 22 y 29 días después de la primera inyección. Los otros grupos mostraron niveles de 11KT similares a los del grupo pcDNA3 a lo largo de todo el experimento.

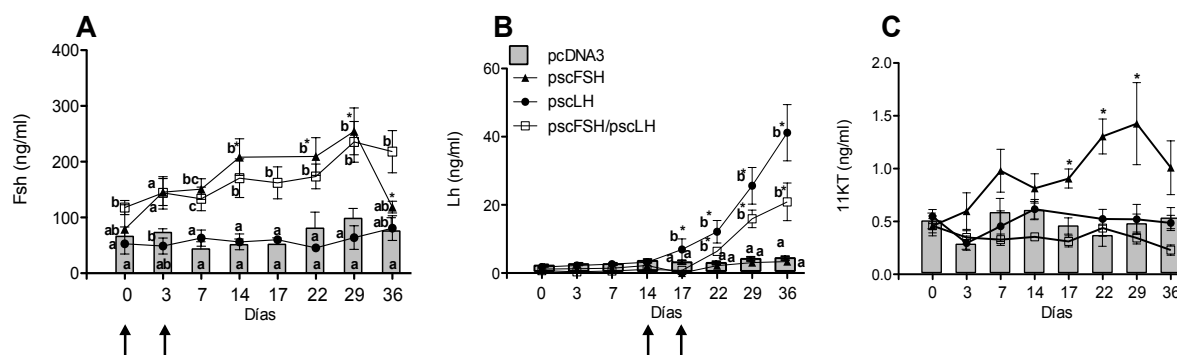


Figura 5.1. (A) Niveles de Fsh en plasma (ng/ml). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo punto de muestreo. Los asteriscos expresan diferencias significativas a lo largo del periodo experimental para el grupo pscFSH. (B) Niveles de Lh en plasma (ng/ml). Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos para un mismo punto de muestreo. Los asteriscos muestran diferencias significativas respecto a día 0. (C) Efecto de las inyecciones sobre los niveles de 11-KT en plasma (ng/ml). Los asteriscos indican diferencias significativas entre el grupo pscFSH/pscLH y el resto de los tratamientos para los correspondientes puntos de muestreo. Las flechas indican los días de inyección. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM (n=15); ($P<0.05$), método Holm-Sidak.

5.3.2. Niveles de expresión de genes gonadales

Genes marcadores de células germinales

Los valores de expresión de *piwi* no variaron en ningún momento durante las tres primeras semanas del experimento (Fig. 5.2A). A partir de ese momento la expresión de *piwi* incrementó significativamente en los grupos pscFSH y pscFSH/pscLH respecto al grupo control y pscLH. Posteriormente la expresión de este gen en el grupo pscFSH disminuyó, pero continuó aumentando en el grupo pscFSH/pscLH y en estos animales el día 36 fue significativamente más elevada que en los otros grupos.

Respecto a *pcna*, en el grupo pscFSH se detectó un pico de expresión el día 29 (Fig. 5.2B), significativamente diferente a los otros grupos, que además también fue significativo respecto

a su propio nivel en el día 0. En el grupo pscFSH/pscLH los niveles de expresión de *pcna* el día 36 también fueron significativamente más altos que en los otros tratamientos y que sus propios niveles a lo largo del periodo experimental. Los grupos pcDNA3 y pscLH no mostraron cambios destacables en la expresión de *pcna* a lo largo del experimento.

La expresión de *scp3* aumentó en el grupo pscFSH el día 29, los valores alcanzados fueron significativamente diferentes a los de los otros grupos en ese mismo día y a la expresión en ese mismo grupo a lo largo del periodo experimental (Fig. 5.2C). En el grupo pscFSH/pscLH la expresión de *scp3* aumentó el día 36, siendo significativamente diferente a la de los otros grupos en ese mismo día y a su propio nivel de expresión en el día 0. En los grupos pcDNA3 y pscLH no se observaron variaciones en la expresión de *scp3*.

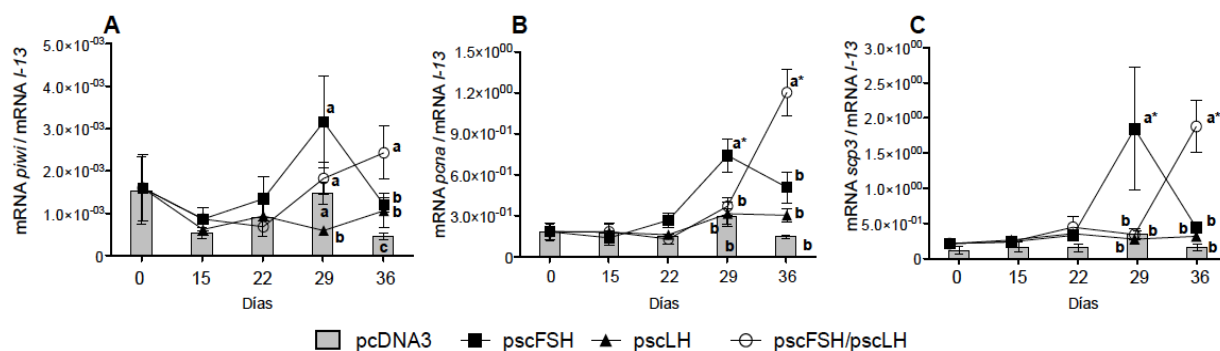


Figura 5.2. Expresión relativa de *piwi* (A), *pcna* (B) y *scp3* (C). Las letras diferentes indican diferencias significativas ente los distintos grupos para un mismo punto de muestro. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al punto inicial. Los niveles de expresión se normalizaron con *l-13 rRNA*. Los datos se representan como la media $\pm$ SEM (n=5); ($P < 0.05$), método Holm-Sidak.

Genes de enzimas esteroideogénicas

Los tratamientos con pcDNA3-scFsh y pcDNA3-scLh modularon de manera significativa la cantidad de transcritos de las enzimas esteroideogénicas *cyp17a1* y *cyp17a2* (Fig. 5.3A y 5.3B). En los grupos pscLH y pscFSH/pscLH, a los 36 días de tratamiento, se detectó un incremento significativo de la expresión de *cyp17a1* respecto a los grupos pcDNA3 y pscFSH. En pcDNA3 y pscFSH, no se observaron cambios significativos de la expresión de estos genes a lo largo del experimento.

En los niveles de expresión de *cyp17a2* (Fig. 5.3B) solo se observaron diferencias significativas entre grupos el día 36, cuando todos los grupos tratados mostraron valores de expresión más altos que el grupo control pcDNA3, siendo el grupo pscFSH/pscLH el que mostró los niveles más elevados que fueron 15 veces más altos que los iniciales. El día 36 los grupos pscFSH y pscLH también presentaron un incremento significativo de la expresión con respecto a su propio nivel del día 0. No se observaron diferencias destacables en el grupo pcDNA3.

En el caso de *3βhsd* no se detectaron cambios de expresión a lo largo del experimento en ninguno de los grupos experimentales (Fig. 5.3C)

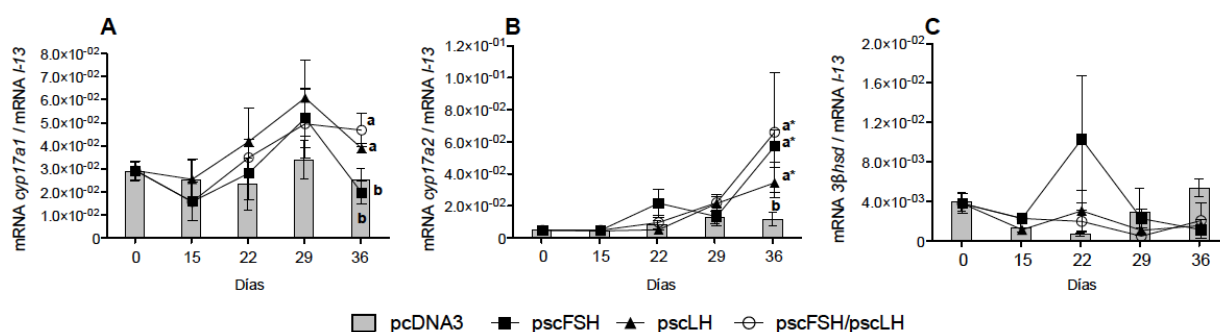


Figura 5.3. Niveles de expresión relativa de *cyp17a1* (A), *cyp17a2* (B) y *3βhsd* (C). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los distintos grupos para un mismo punto de muestro. Los asteriscos indican diferencias respecto al punto inicial. Los niveles de expresión se normalizaron con *l-13 rRNA*. Los datos se representan con la media $\pm$ SEM (n=5); ($P < 0.05$), método Holm-Sidak.

Niveles de expresión de factores paracrinós

Los tratamientos con pcDNA3-scFsh y pcDNA3-scLh dieron lugar a una regulación diferencial de los niveles de mRNA de *egfra* y *egfrb*. En los grupos pscFSH y pscFSH/pscLH, el tratamiento con pcDNA3-scFsh provocó un incremento de la expresión de *egfra* a los 15 días tras la primera inyección que fue significativamente superior a los niveles del grupo control y pscLH (Fig. 5.4A). Los niveles de expresión en el grupo pscFSH decrecieron significativamente el día 29, mientras que en el grupo pscFSH/pscLH permanecieron estables hasta el final del experimento.

En el grupo pscFSH la expresión de *egfrb* incrementó progresivamente de manera que el día 22 fue significativamente superior a la del resto de los grupos (Fig. 5.4B) regresando a los

niveles basales el día 36. En los grupos pscLH y pcDNA3 se observó una reducción de la expresión en el día 22 que fue significativa respecto a la observada en el día 0.

En los grupos tratados con pcDNA3-scFsh los niveles de mRNA de *igf3* incrementaron de manera significativa 15 días después de la primera inyección. Los niveles de expresión en el grupo pscFSH se mantuvieron significativamente superiores a día 22 respecto a los restantes grupos (Fig. 5.4C). Al final del experimento la expresión de *igf3* incrementó nuevamente en ambos grupos, siendo significativamente diferente de la de los grupos pcDNA3 y pscLH.

El perfil de expresión de *btc* (Fig. 5.4D) muestra un incremento significativo en el grupo pscFSH el día 36, siendo diferente al de los otros tratamientos y a sus propios niveles respecto al punto inicial. Para este gen no se detectaron diferencias significativas en los restantes grupos experimentales.

No se observaron diferencias significativas en la expresión de *amh* entre los grupos tratados a lo largo del experimento (Fig. 5.4E).

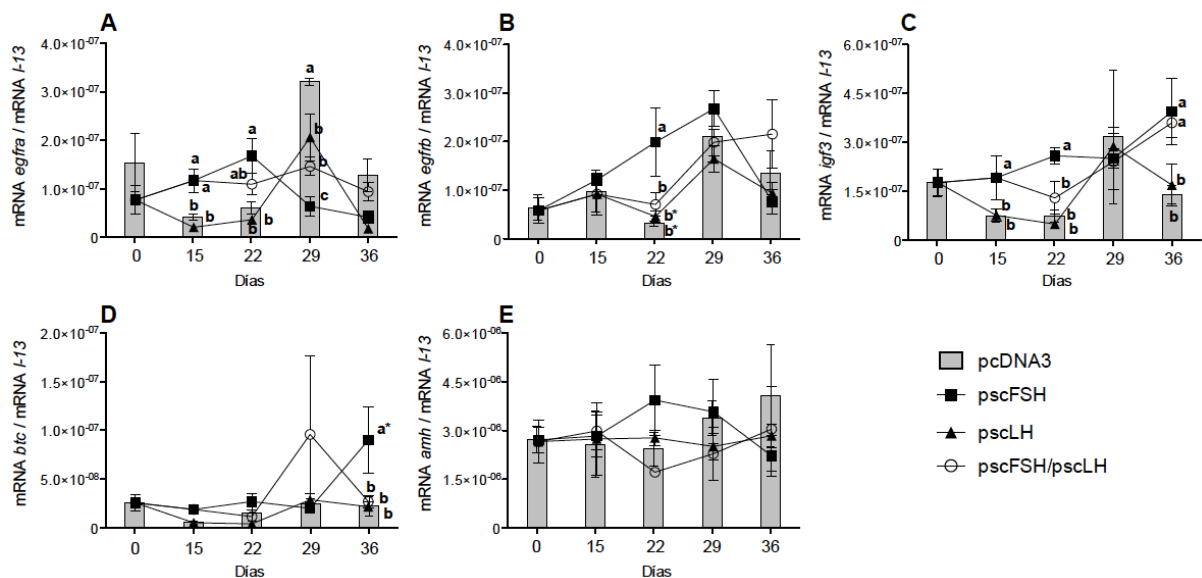


Figura 5.4. Niveles de expresión relativa de *egfra* (A), *egfrb* (B), *igf3* (C), *btc* (D) y *amh* (E). Las letras diferentes indican diferencias significativas ente los distintos grupos para un mismo punto de muestro. Los asteriscos indican diferencias respecto al punto inicial. Los niveles de expresión se normalizaron con *l-13 rRNA*. Los datos se representan como la media±SEM (n=5); ($P<0.05$), método Holm-Sidak.

Niveles de expresión de los receptores *fshr*, *lhr* y *ar*

En el grupo pscFSH los niveles de los transcritos de *fshr* incrementaron paulatinamente con un pico de expresión en el día 29 (Fig. 5.5A) que fue significativamente diferente de los restantes grupos experimentales y de su propio nivel en el día 0. No se detectaron diferencias significativas en los grupos pcDNA3, pscFSH/pscLH y pscLH a lo largo del experimento.

En los grupos pscFSH y pscFSH/pscLH se detectó un incremento del nivel de expresión del *lhr* 5 semanas después del inicio del experimento que fue significativamente diferente al observado en los grupos pcDNA3 y pscLH (Fig. 5.5B). En estos últimos, los niveles de *lhr* permanecieron estables durante todo el experimento.

No se observaron cambios significativos de la expresión de *ar* en ningún grupo a lo largo del experimento (Fig. 5.5C).

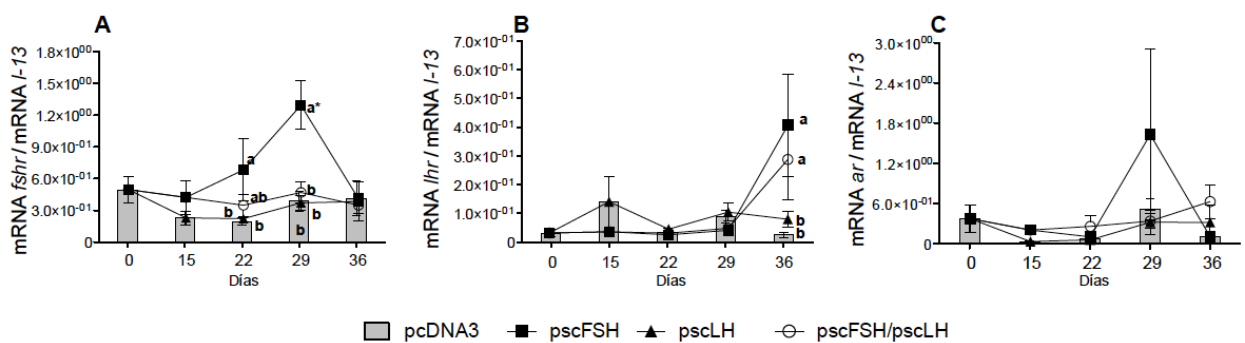


Figura 5.5. Niveles de expresión relativa de mRNA de *fshr* (A), *lhr* (B) y *ar* (C). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los distintos grupos para un mismo punto de muestreo. Los asteriscos indican diferencias respecto al punto inicial. Los niveles de expresión se normalizaron con *l-13 rRNA*. Los datos se representan como la media ± SEM (n=5); ($P < 0.05$), método Holm-Sidak.

5.3.3. Evaluación histológica del desarrollo testicular

El efecto de los tratamientos con pcDNA3-scFsh y/o pcDNA3-scLh sobre el avance de la espermatogénesis se evaluó mediante observación al microscopio de preparaciones histológicas de los testículos, y clasificación de su estado de desarrollo de acuerdo a Begtashi et al. (2004). Al final del experimento, el 64% de los animales del grupo pcDNA3 estaban en estado I de maduración (inmaduros), caracterizado por la presencia de SpgA (Fig. 5.6), el 29% se encontraban en estado II (recrudescencia temprana) que contiene abundantes SpgA diferenciadas y SpgB, y algunos espermatocitos de primer orden; y el 7 % estaban en estado

III (recrudescencia media), donde el testículo claramente ha entrado en meiosis. El tratamiento con scLh no generó cambios a nivel histológico, mostrando este grupo un 75% de animales en estado I y un 25% de animales en estado II.

En los grupos pscFSH y pscFSH/pscLH, las inyecciones con pcDNA3-scFsh generaron una reducción notable en la proporción de animales en estado I, mostrando un 11% y un 9% respectivamente. Como consecuencia en ambos grupos se observó un incremento del porcentaje de animales en estados II y III. En el grupo pscFSH el 67% de los peces estaban en estado II y el 22% en estado III, pero no se observaron estados más avanzados. En el grupo pscFSH/pscLH la proporción fue similar, con un 18% de los peces en estado II y un 55% en estado III. En este caso si se detectaron estados más avanzados de manera que el 19% de los peces estaban en estado IV (recrudescencia tardía), cuando todos los tipos de células germinales están presentes (Fig. 5.6).

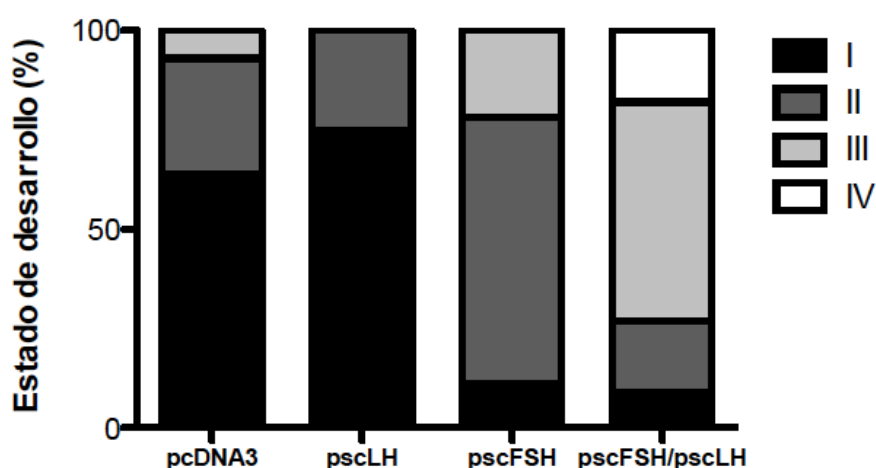


Figura 5.6. Efecto de los tratamientos sobre el estado de desarrollo de los testículos. Frecuencia relativa, en porcentaje, de los estados gonadales al final del experimento. Clasificado según Begtashi et al., 2004. Estado I= inmaduro, Estado II= maduración temprana, Estado III= maduración media, Estado IV=maduración tardía.

5.4. Discusión

En este capítulo se ha usado la transferencia génica somática como metodología para liberar gonadotrofinas recombinantes (Fsh y/o Lh) al torrente sanguíneo de la lubina. Esta estrategia, usada previamente con éxito (Mazón et al., 2013 y 2014) y ya descrita en los capítulos anteriores (capítulos 3 y 4), ha permitido estudiar, por separado o en combinación,

la acción de la Fsh y de la Lh sobre la activación y progresión de la espermatogénesis de este Perciforme. Cuando se evaluó el efecto 36 días después de la primera administración se observó que estas hormonas actúan de forma diferencial, tanto sobre el desarrollo testicular, como sobre la expresión de determinados genes.

La espermatogénesis es un proceso esencial que culmina con la producción de gametos masculinos asegurando así la supervivencia de las especies. Por tanto, para poder solucionar posibles disfunciones reproductivas es crucial comprender como se regula este proceso. En el caso particular de los peces, tanto el control molecular como hormonal de la reproducción se van esclareciendo gradualmente (para más información Schulz et al., 2010; Miura y Miura, 2011). En este contexto el estudio de la función de las dos hormonas que lo controlan, como son la Fsh y la Lh, se ha encontrado con varios cuellos de botella, casi siempre relacionados con la ausencia de herramientas adecuadas para medir sus niveles en plasma (Levavi-Sivan et al., 2010). Como se ha mencionado anteriormente, en este capítulo se aborda este problema valiéndonos de la transferencia génica somática como alternativa a los tratamientos hormonales tradicionales.

Aunque estudios anteriores en mamíferos (Abel et al., 2000 Yazawa et al., 2002) y en peces (Schulz et al., 2010) desvelaron la relevancia de la FSH en el control de la espermatogénesis, todavía no se sabe si la Fsh por sí misma es capaz de dirigir este proceso en su totalidad, esto es desde la proliferación de las células germinales hasta la espermiación. Anteriormente habíamos visto que el tratamiento de machos inmaduros de lubina (Capítulo 4, Mazón et al., 2014) con scFsh promovía la proliferación de las células germinales y como consecuencia incrementaba el número de espermatogonias B tardías y de cistes de espermatocitos. Sin embargo, la duración del experimento no fue suficiente para evaluar si se podían alcanzar estados más avanzados de la espermatogénesis, como por ejemplo la espermiación. Además, el papel de la Lh durante la espermatogénesis de la lubina todavía no está estudiado.. En este capítulo los tratamientos de ejemplares juveniles inmaduros de lubina se prolongaron 5 semanas con scFsh y 3 semanas con scLh. Además, con el fin de reproducir la acción fisiológica consecutiva de ambas hormonas, se constituyó un tercer grupo experimental donde la inyección con pcDNA3-scFsh se suplementó con una de pcDNA3-scLh. Los tratamientos con scFsh solo incrementaron la maduración de las gónadas, pero no provocaron espermiación. Aparentemente en lubina para generar una espermatogénesis completa es necesario el estímulo de la Lh, puesto que los peces del grupo pscFSH/pscLH fueron los únicos que presentaron espermatozoides en el testículo. A pesar de que la acción de la Fsh, en sí

misma, no es suficiente para impulsar la maduración completa del testículo, si es esencial en las fases iniciales de la recrudescencia testicular, ya que la estimulación solo con Lh no desencadenó este proceso, tal y como se pone en evidencia en el grupo pscLH. Esto también se puso de manifiesto al evaluar los niveles de mRNA de algunos genes marcadores de células germinales. *Piwi* es una proteína que se expresa, exclusivamente, en las células germinales gonadales (Houwing et al., 2007). Está implicada en el mantenimiento de las células madre de la línea germinal (Cox et al., 2000), aunque también se expresa en células germinales en meiosis temprana, por lo tanto también se expresa en los espermatocitos (Dan et al., 2002; Howing et al., 2007). En los grupos pscFSH y pscFSH/pscLH se observó un incremento en la expresión de *piwi*, lo cual es consistente con el aumento en el número de células germinales, sobre todo de StgB, dado que este gen se expresa más en estas espermatogonias que en las StgA (Cox et al., 2000). El perfil de expresión de *pcna*, gen marcador de proliferación celular, fue parecido al observado en *piwi*. El factor Pcn se ha usado en numerosas especies como marcador de proliferación de espermatogonias, aunque su expresión también se ha descrito en espermatocitos (revisado en Yazawa et al., 2000). El incremento en los niveles de expresión de este gen, en los grupos pscFSH y pscFSH/pscLH, el día 36 coincide con la presencia abundante de espermatogonias B tardías y de cistes de espermatocitos como consecuencia de la proliferación de espermatogonias A. El tercer gen marcador de células germinales analizado, *scp3*, mostró una expresión más elevada en los grupos tratados con pcDNA3-scFsh transcurridos 29 y 36 días de la primera inyección, lo cual es consistente con la presencia de cistes de espermatocitos en ambos grupos. Todos estos resultados refuerzan la noción de que la Fsh tiene una actividad proliferativa, como se menciona más arriba. Por otro lado, no parece que la Lh esté directamente implicada en la proliferación de las células germinales, ya que en el grupo pscLH no se detectó un incremento de la expresión de *piwi*, *pcna* o *scp3*. Sin embargo el hecho de que la expresión de *pcna* y *scp3* fuera más elevada en el grupo co-inyectado podría indicar que la proliferación y la supervivencia de las espermatogonias requiere de la actividad de la Lh (Allan et al. 2004). Dado que el *lhr* se expresa en células de Leydig (García-López et al., 2010), la acción principal de la Lh sería la de inducir la síntesis de esteroides (Schulz y Miura, 2002). La 11KT es el principal andrógeno en peces y su función durante la recrudescencia testicular es esencial ya que es capaz de inducir la espermatogénesis en su totalidad (Leal et al., 2009; Miura et al., 1991a y b). En lubina, se ha detectado un incremento en los niveles plasmáticos de 11KT en las etapas tempranas de la recrudescencia gonadal (Rocha et al., 2009; Rodríguez et al., 2001). También se obtuvo un incremento en 11KT tras el tratamiento de machos pre-

púberes con scFsh (Capítulo 4, Mazón et al., 2014) o tras la estimulación *in vitro* de fragmentos de testículo con Fsh nativa (Molés et al., 2008) y con Fsh y Lh recombinantes (Molés et al., 2011b). Estos resultados corroboran dos conceptos importantes: los andrógenos están más vinculados a la espermatogénesis que a la espermiación y su producción es Fsh/Lh dependiente. En este capítulo el grupo pscFSH/pscLH fue el que mostró el estado de espermatogénesis más avanzado y en el que, a su vez, se detectó un incremento significativo de los niveles plasmáticos de 11KT.

En el grupo pscLH no se observaron cambios significativos en los niveles de 11KT circulante, no obstante la Lh moduló la expresión de algunos genes de enzimas esteroidogénicas como *cyp17a1* y *cyp17a2*. En este trabajo, la expresión de *cyp17a1* y *cyp17a2* varió durante la espermatogénesis inducida por las gonadotrofinas recombinantes, pero permaneció en el mismo nivel en los animales control, es más, este es el primer trabajo en el que registra la expresión de *cyp17a2* durante la espermatogénesis de un pez teleósteo. Sería de esperar que los niveles de expresión de *cyp17a1* incrementaran como consecuencia de la actividad de la Fsh, tal y como se ha descrito en el pez cebra (García-López et al., 2010), la anguila japonesa (Kazeto et al., 2008) y en ratón (Abel et al., 2000). Sin embargo en nuestro caso observamos que fueron los grupos tratados con pcDNA3-scLH los que presentaron una mayor expresión al final del periodo experimental. De estos perfiles de expresión no podemos concluir si en la lubina la expresión de esta enzima es consecuencia de la acción de la Fsh o de la Lh. Por otro lado, la expresión máxima de *cyp17a2* en los grupos tratados con pcDNA3-scFsh se registró al final del experimento, cuando los testículos estaban más desarrollados. La relevancia de la enzima Cyp17a en la síntesis de esteroides gonadales ya se ha demostrado en diferentes especies de peces (Chen et al., 2010a), pero la existencia de dos genes distintos, denominados *cyp17a1* y *cyp17a2*, que codifican dos isozimas con diferente actividad se había descrito sólo en una especie (Zhou et al., 2007a). En tilapia la Cyp17 tipo I presenta actividad liasa e hidroxilasa, mientras que la tipo II carece de la actividad liasa (Zhou et al., 2007b), lo cual sugiere que en el ovario la de tipo I está implicada en la síntesis de E2 y la de tipo II en la síntesis de DHP. Es interesante el hecho de que exista un paralelismo entre los niveles de mRNA descritos para los testículos de lubina en este capítulo y los observados en el ovario de tilapia durante el periodo de puesta (Zhou et al., 2007b). En la espermatogénesis de peces, la DHP es importante en la hidratación y adquisición de motilidad por parte del espermatozoide (Miura y Miura, 2011), razón por la cual se pueden encontrar los receptores para DHP en los espermatozoides (Miura y Miura 2003;

Thomas et al., 1997). Tal y como se describe más arriba la síntesis de DHP es consecuencia de la actividad de la *Cyp17a2*, por tanto se podría asumir que la expresión de *cyp17a2* debería incrementar durante la espermatogénesis tardía y antes de la espermiación, explicando así el pico de expresión que se detecta el día 36 en los grupos pscFSH/pscLH y pscFSH, y con menor impacto en el grupo pscLH. En este capítulo no se evaluaron los niveles plasmáticos de DPH, dado que previamente se había demostrado que en lubina estos no variaban durante la espermiación (Mañanós et al., 2002), pero sería interesante el poder encontrar otro MIS que ayude a discernir si *cyp17a2* está implicado en su síntesis. Las diferencias encontradas en la regulación de estos genes por parte de la Fsh y la Lh en la lubina, respecto a otras especies de peces, posiblemente se deban a la diversidad existente entre las distintas especies en las rutas de regulación de estas enzimas. Sería preciso una caracterización más profunda de todo el sistema para comprender los mecanismos que regulan la producción de MIS en el testículo de la lubina.

Se sabe que el receptor del EGF y sus diferentes ligandos están implicados en la regulación de la función gonadal (Conti et al, 2006). Además es un hecho sabido que el EGF tiene un papel fisiológico importante en la espermatogénesis, ya que la ablación de la glándula salival (principal fuente de EGF) restringe la espermatogénesis (Wong et al., 2000). Los antecedentes acerca de la implicación de los péptidos similares a EGF y de los receptores de EGF en la espermatogénesis de peces son escasos. Se han clonado dos *egfr* diferentes en *Xiphophorus* (Gómez et al., 2004) y en medaka (Laisney et al., 2010), siendo la lubina la tercera especie de pez en la que se describen los *egfra* y *egfrb*. Sin embargo no existía información respecto a su expresión a lo largo de la espermatogénesis. En este capítulo se describe la expresión de *egfra* y *egfrb* durante la espermatogénesis de lubina inducida por la administración de gonadotrofinas. Tras la primera administración de Fsh se observó que la expresión de *egfra* incrementaba de manera paulatina durante tres semanas. De manera similar en ese mismo grupo (pscFSH) también se observó un incremento paulatino en la expresión de *egfrb*. En mamíferos el *Egfr* se expresa a lo largo de todo el proceso de espermatogénesis (Abé et al., 2008), principalmente en espermátocitos y espermátidas (Caussanel et al., 1996), pero todavía no está claro si sólo se expresa en las células germinales del testículo (Kassab et al., 2007) o también en las somáticas (Caussanel et al., 1996). Aunque al principio del experimento, tras el tratamiento con pcDNA3-scFsh, se observó un incremento de la expresión de ambos receptores en este grupo, al final del periodo experimental todos los grupos mostraron niveles similares, lo cual sugiere que la expresión de

estos receptores ocurre durante todo el proceso de espermatogénesis y no solo durante los estados más avanzados de maduración testicular.

Los ligandos del Egfr muestran funciones redundantes, con similitudes en su actividad (Dunbar y Goddard, 2000). En general, estos péptidos están implicados en la regulación del desarrollo de las células germinales (Niederberger, et al., 1993). A través de un exhaustivo estudio con miembros de la familia de Egf, realizado en medaka, se observó que el ligando Btc presentaba mayor expresión en testículo, en comparación con la de otros órganos (Laisney et al., 2010). En consecuencia, en este capítulo se optó por estudiar su posible implicación en la espermatogénesis. En el grupo pscFSH este gen muestra una expresión muy elevada al final del experimento. Btc es un ligando del Egfr caracterizado solo en mamíferos, donde se le ha descrito como un mediador de la LH (Ashkenazi et al., 2005) implicado en la proliferación y diferenciación celular (Caussanel et al., 1996). A diferencia de lo observado por nosotros en testículo de lubina, la Lh es capaz de incrementar la expresión de *Btc* en células foliculares de ovario de rata (Ashkenazi et al., 2005). Por otro lado la expresión de Btc incrementa significativamente en la vitelogénesis temprana de hembras de pez cebra (Tse y Ge, 2010), un proceso controlado fundamentalmente por la Fsh y escasamente por la Lh.

Este trabajo muestra los primeros datos de expresión de algunos miembros de la familia del Egf durante la espermatogénesis de lubina. No obstante, para entender bien la función y regulación de este proceso se precisa una mejor caracterización de este sistema paracrino. Aunque en peces la espermatogénesis está principalmente bajo el control de las GtHs, el sistema Egfr testicular tiene gran importancia en la mediación y regulación de sus acciones, dadas las evidencias existentes acerca de la implicación del Egfr en la esteroidogénesis inducida por GtH (Evaul y Hammes, 2008).

Las GtHs ejercen su acción mediante la activación de sus respectivos receptores, Fshr y Lhr, y en lubina esta unión es específica de manera que no existe reacción cruzada alguna (Molés et al., 2011b). De acuerdo con estudios anteriores (Capítulo 4, Mazón et al., 2014), en este capítulo se ha observado un incremento significativo de los transcritos de *lhr* tras el tratamiento con scFsh, ello sugiere que para que progrese la espermatogénesis en respuesta a la Lh, se precisa de la acción previa de la Fsh (Odell et al., 1973 y 1974). Sin embargo, la diferente maduración gonadal alcanzada por los grupos pscLH y pscFSH/pscLH no puede deberse únicamente al nivel de expresión del receptor, ya que semanas antes de que aumentaran los niveles de expresión del *lhr* en el grupo pscFSH/pscLH, ya se observaron

distintos niveles de producción de 11KT y una expresión distinta de ciertos genes entre estos dos grupos. En el capítulo anterior (Mazón et al., 2014) no se pudo evaluar si la Fsh regulaba la producción de Lh por limitación en la cantidad de muestra. En este capítulo se ha confirmado que el tratamiento con pcDNA3-scFsh no incrementó los niveles plasmáticos de Lh (grupo pscFSH), ello nos permite concluir que el incremento en la expresión de *lhr*, observado en este grupo, es consecuencia de la acción de la Fsh.

De manera global, los diferentes efectos generados por los tratamientos con Fsh y/o Lh sobre la regulación de la proliferación celular y la expresión de enzimas esteroideogénicas, ilustran claramente que estas dos hormonas regulan la función testicular de manera diferencial. Este capítulo afianza el papel de la Fsh como inductor de la espermatogénesis en machos de lubina mediante el incremento en la proliferación y diferenciación de las espermatogonias. Además, también demuestra que la acción principal de la Lh parece ser la de sustentar la demanda de esteroides, mediante la regulación de la expresión de enzimas esteroideogénicas, aunque esto no es suficiente para desencadenar el proceso de espermatogénesis en animales inmaduros esto es, con testículos en estado pre-meiótico.

Capítulo 6:

Participación de las rutas de señalización AMPc/PKA y MAP quinasa en la síntesis de esteroides estimulada por Fsh en dos especies de teleósteos, *Dicentrarchus labrax* y *Danio rerio*

Manuscrito en preparación: Maria José Mazón, Silvia Zanuy, Rafael H. Nóbrega, Rüdiger W. Schulz y Ana Gómez

Resumen

La Fsh es necesaria para alcanzar con éxito la maduración gonadal. Su acción se ejerce mediante la interacción con su receptor específico, un receptor de transmembrana acoplado a proteínas G (GPCR). La activación de las proteínas G regula un patrón complejo de expresión génica a través de diferentes vías de señalización. En el presente trabajo la estimulación *in vitro* de ovarios y testículos de dos especies distintas de peces teleósteos, lubina y pez cebra, con Fsh dió lugar a un incremento de la producción de esteroides. Cuando se administró un análogo del AMPc (8Br-cAMPs) se obtuvieron resultados similares. Sin embargo el tratamiento con dos inhibidores de la ruta AMPc/PKA denominados Rp-cAMPs y H89 bloqueó la producción de algunos esteroides significativamente. Estos tratamientos también afectaron a la expresión de genes que codifican diferentes enzimas esteroidogénicas, destacando que la ruta AMPc/PKA puede regular directamente los niveles de transcripción de *star* y *cyp19a1a*. El tratamiento con PD98059, un inhibidor específico de MEK1/2, generó una inhibición importante de los niveles de esteroides estimulados por la Fsh y el 8Br-cAMPs, mostrando que la Fsh también usa la ruta MEK1/2 para transmitir su señal a nivel intracelular. La inhibición de MEK1/2 provocó la disminución de la expresión de *cyp17a1*, *cyp19a1a*, *star* y *3 β hsd*. Todos estos resultados sugieren que la Fsh regula de manera diferente ambas rutas (AMPc/PKA y MAPk) para inducir la síntesis de esteroides

6.1. Introducción

En los peces teleósteos, como en los mamíferos, el inicio y estimulación sucesiva del proceso de gametogénesis están regulados principalmente por las GtHs, Fsh y Lh. Ambas GtHs actúan a través de la interacción con sus receptores específicos. El receptor de Fsh, al igual que el de Lh, es un receptor de membrana acoplado a proteínas G que en el ovario se expresa en las células de la granulosa, y en el testículo en las células de Sertoli y de Leydig. Estos receptores estimulan proteínas G_s lo que genera un incremento en AMPc. Este segundo mensajero guía la translocación de la subunidad catalítica de la proteína quinasa A (PKA) al núcleo y allí ésta fosforila a las proteínas que se unen a elementos de respuesta a AMPc (CREB, *cAMP response element binding protein*) (Mukherjee et al., 1996; Salvador et al., 2001). Los sitios CRE se han encontrado sólo en un pequeño número de promotores de genes regulados por la Fsh, como por ejemplo los de la inhibina-a, *cyp19a1a* y *c-fos* (Hunzicker-Dunn and Maizels, 2006), y sitios mitad-CRE se han encontrado en el promotor de *star* (Hunzicker-Dunn and Maizels, 2006). Por lo tanto los sitios CRE puede que no sean los únicos lugares de los promotores que median en la activación de genes estimulados por Fsh (Hunzicker-Dunn and Maizels, 2006).

Es bien conocido que en los mamíferos las células esteroideogénicas emplean la ruta de la PKA para inducir la síntesis de esteroides a través de la activación de enzimas esteroideogénicas y de la regulación de la expresión de sus genes codificantes, tales como *Star* (Ariyoshi et al., 1998; Manna et al., 2003a; Stocco, 2000) y *Cyp19a* (Young and Mcphaul, 1998), mediante la activación de sitios CRE. En el caso de *Star* se ha descrito que la PKA tipo I y la tipo II se complementan en la coordinación de la regulación de esta proteína (Dyson et al., 2009). Mientras que la de tipo I parece activar la transcripción del gen *Star*, la de tipo II parece ser responsable de la fosforilación de la proteína Star. En la secuencia de aminoácidos de Star, en varias especies de peces (Castillo et al., 2008; Kusakabe et al., 2009; Li et al., 2009), se han observado secuencias conservadas que corresponderían a sitios potenciales de fosforilación de serinas mediante la PKA. Por tanto, se asume que en los peces existe una relación entre la PKA y la regulación de Star similar a la descrita en mamíferos.

Existen otros factores de transcripción que se unen a sitios CRE, tales como la proteína moduladora CRE (CREM) y el factor activador de transcripción (ATF-1) (Manna et al.,

2003b), los cuales también pueden activarse por la ruta AMPc/PKA. Sin embargo, no todos los genes ligados a la síntesis de esteroides presentan este tipo de sitios CRE en su promotor, por lo que la presencia de otros factores de transcripción modulados por la ruta de AMPc/PKA (referencias en Manna et al., 2003a), como el factor esteroideogénico 1 (SF-1), puede ser crítica (Lala et al., 1992; Morohashi et al., 1993).

En varias especies se han descrito otras rutas intracelulares, además de la de AMPc/PKA, que también se activan por la Fsh. Entre éstas se ha identificado la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPk) que actúa en la regulación de la esteroideogénesis en mamíferos (Gyles et al., 2001; Otis y Gallo-Payet, 2007) y en peces (Benninghoff and Thomas, 2006; Paul et al., 2010). Las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) pertenecen a la familia de las MAPks y son fosforiladas por las MAP quinasa quinasa (MEK1 y MEK2). Es probable que las ERKs se regulen por la ruta de AMPc/PKA, sin embargo los resultados a este respecto no son claros y dependen en gran medida de la especie o del tipo celular empleado en el estudio. Así, en las células tumorales de Leydig MA-10 (Poderoso et al., 2009) y en células de la granulosa de rata (Cottom et al., 2003; Das et al., 1996) se demostró que la fosforilación de ERK1/2 está mediada por AMPc/PKA como resultado de la actividad de la FSH. Sin embargo en otros estudios con células musculares humanas o fibroblastos de rata (Graves et al., 1993; Wu et al., 1993) la acción del AMPc inhibe la cascada de las ERKs. También se pueden encontrar resultados ambiguos en la literatura respecto a la regulación de la esteroideogénesis por las ERKs. En células de la granulosa de rata (Seeger et al., 2001) se ha descrito una reducción en la síntesis de esteroides por acción de las ERKs, corroborado más tarde en células de la granulosa humanas (Tajima et al., 2003). Por el contrario, algunos trabajos describen que la ruta de AMPc/PKA depende de las ERKs para inducir la síntesis de esteroides (Otis and Gallo-Payet, 2007; Poderoso et al., 2009). En peces, la información respecto a la implicación de la ruta de la MAPk en el proceso de esteroideogénesis, activado por GtHs, es escasa, limitándose a dos referencias que describen la implicación de MEK1/2 en la respuesta a hCG (Benninghoff and Thomas, 2006; Paul et al., 2010).

En peces se ha demostrado tanto *in vitro* (García-López et al., 2008; Kazeto et al., 2008; Moles et al., 2008; Moles et al., 2011b; Ohta et al., 2007; Planas et al 1997) como *in vivo* (Kobayashi et al., 2006); Mazón et al., 2014, capítulo 4) que la Fsh regula la síntesis de esteroides. Uno de los puntos clave para entender como controla la Fsh este proceso es

caracterizar sus rutas de acción intracelular y la modulación de la expresión de los genes de enzimas esteroideogénicas. En peces se ha sugerido que la ruta más empleada por la Fsh, para regular la síntesis de esteroides, es la de AMPc/PKA (García-López et al., 2008; Planas et al., 1997), pero no se sabe como esta ruta y la de la MAPk regulan la expresión de los genes esteroideogénicos.

En este capítulo se pretendía determinar las rutas de señalización intracelular promovidas por la Fsh para activar la síntesis de esteroides en dos especies de peces teleósteos, lubina y pez cebra. Hemos evaluado la implicación de las rutas de AMPc/PKA y de la MAPk en la síntesis de esteroides y en la expresión de algunos genes que codifican enzimas esteroideogénicas, así como la comunicación potencial entre ambas rutas para regular este proceso.

6.2. Material y métodos

6.2.1. Activadores, inhibidores, anticuerpos y otros reactivos

La hormona Fsh recombinante de cadena única, scFsh, se produjo empleando un clon de células CHO (Molés et al. 2011b) tal y como se describe en el capítulo 4 de este manuscrito. La Fsh recombinante de pez cebra (zfFsh) se produjo según (García-López et al., 2010). El activador de la PKA 8Br-cAMPs y el inhibidor de la PKA Rp-cAMPs (ambos análogos de la molécula señalizadora natural, el AMPc) se adquirieron en BIOLOG Life Science Institute (Bremen, Alemania). El inhibidor de la PKA KT5720 y de la Map quinasa quinasa PD98059 procedían de Calbiochem. El inhibidor de la PKA H-89, la forskolina y la albúmina de suero bovino (BSA) se obtuvieron en Sigma-Aldrich, Inc. Los anticuerpos policlonales de conejo contra MAPk p44/42 totales (t-Erk 1/2) (ref. 9102) y contra MAPk p44/42 fosforiladas (p-Erk 1/2) (ref. 4377) se obtuvieron en Cell Signaling Technology. El anticuerpo secundario anti-conejo marcado con HRP provenía de BioRad Laboratories. Los inhibidores de proteasas PMSF, aprotinina y leupeptina, y los inhibidores de fosfatasa NaF y Na_3VO_4 se compraron en Sigma-Aldrich, Inc.

6.2.2. Optimización de las dosis de inhibidores y activadores

Ruta AMPc/PKA

Para los experimentos en lubina los inhibidores y el activador de la PKA se evaluaron previamente en un clon estable de células HEK-293 que contiene el Fshr de lubina y el plásmido pCRE-LUC (Rocha et al., 2007). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos

y se pre-incubaron con los inhibidores KT5720 o Rp-cAMPs a las dosis e intervalos de tiempo indicados. A continuación, las células se trataron con los activadores scFsh, forskolina o 8Br-cAMPs. Al finalizar las incubaciones, las células se recolectaron, se lisaron empleando *Reporter Lysis Buffer* (Promega) y se centrifugaron para eliminar los restos celulares. Para medir la actividad luciferasa se mezclaron 20 µl del sobrenadante con 200 µl del reactivo de luciferina (Tricine KOH 20 mM, pH 7.8, EDTA 0.1 mM, MgCl₂ 8 mM, DTT 33.3 mM, CoA 270 µM, ATP 530 µM, luciferina 400 µM). La luz emitida se midió en un luminómetro (Junior, EG&G, Berthold) y se expresó como RLU.

La inhibición de la ruta de AMPc/PKA en gónadas de pez cebra se realizó con un protocolo ya establecido usando el inhibidor H-89 (Garcia-Lopez et al., 2010).

Ruta MAPk

Con el fin de determinar la efectividad de PD98059 en la inhibición de la señalización de las MAPks, tras la activación del Fshr, evaluamos la fosforilación de ERK1/2 empleando la línea celular HEK-293 que expresa de manera estable el *fshr* de lubina. Las células se sembraron en placas de 48 pocillos y se pre-incubaron en medio DMEM libre de suero durante 6 h y se trataron durante 30 min con los inhibidores Rp-cAMPs (5 µM) y/o PD98059 (50 µM) diluidos en DMEM libre de suero. A continuación se trataron con los activadores scFsh (100 ng/ml) u 8Br-cAMPs (10 mM) y la incubación se prolongó 30 min más. Tras la incubación el medio se eliminó, las células se lavaron con PBS y se recolectaron y lisaron en 100 µl de tampón de lisis (Nonidet P40 1%, ortovanadato de sodio 0.4 mM, Tris-HCl (pH 7.6) 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NaF 50 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml). El contenido en proteína se determinó mediante el kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) y posteriormente se realizó una electroforesis en poliacrilamida-SDS de 60 µg de proteína por tratamiento. Las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF (Immobilon P, Millipore Corp.). La membrana se incubó en tampón de bloqueo consistente en leche descremada al 5% en TBS-T (TrisHCl 10 mM, NaCl 150 mM y Tween-20 0.1%) durante 60 min a temperatura ambiente. Tras varios lavados con TBS-T, ésta se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (para MAPks totales o fosforiladas) a una dilución final de 1:500 en tampón de bloqueo. Después la membrana se lavó en TBS-T y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a HRP a una dilución 1:3000. Tras un lavado final con TBS-T el anticuerpo secundario se reveló mediante un kit de

quimioluminiscencia (*Western blotting luminal reagent*, Santa Cruz Biotechnology, Inc). Las imágenes se detectaron usando el sistema VersaDoc (BioRad).

6.2.3. Cultivo primario de gónada de lubina y pez cebra

El cultivo *in vitro* de tejido gonadal de lubina se realizó siguiendo el protocolo puesto a punto por Planas et al. (1997) y modificado para la lubina por (Molés et al., 2008a). Se utilizaron animales juveniles pre-púberes de lubina que se sacrificaron con una sobredosis en fenoxietanol y después se decapitaron. Los peces se sacrificaron siguiendo la legislación española (Real Decreto Act 53/2013) y europea (2010/63EU) concerniente a la protección de animales de experimentación. El protocolo empleado para su sacrificio fue aprobado por el Comité de Bienestar animal del IATS (Número de Registro 09-0201) supervisado por el Ministerio de Medio Rural y Marino.

Las gónadas se dispusieron en solución Ringer de lubina (SBR, de acuerdo a (Sorbera et al., 1999)) a la que se le añadió BSA al 0.5% y 100 unidades/ml de penicilina/estreptomicina. Las gónadas, procedentes de distintos peces, se procesaron por separado. Cada una se troceó con un escalpelo sobre una superficie fría hasta su completa homogenización. El tejido se lavó tres veces en 10 ml de SBR frío. El medio conteniendo el tejido se centrifugó 10 min a 60xg y 4°C después de cada lavado, el sobrenadante se desechó y se añadió solución fresca. Tras el tercer lavado el tejido se filtró a través de una malla de nylon de 750 µm (para testículo) y de 150 µm (para ovario). Se transfirieron aproximadamente 20 mg de gónada a cada pocillo de placas de 48 pocillos que contenían 250 µl de SBR cada uno. El tejido se incubó durante 30 min a 20°C en agitación (100 rpm). Tras esta pre-incubación el medio se desechó y se añadieron 250 µl de SBR fresco con los correspondientes tratamientos. El cultivo se mantuvo durante 18h a 20°C en atmósfera húmeda. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y cada experimento se repitió al menos tres veces.

El cultivo de gónada de pez cebra se realizó usando 8 ejemplares por tratamiento y siguiendo un protocolo ya descrito (García-López et al., 2010). Las gónadas se extirparon y se lavaron en PBS con lejía al 0.5%. Tras varios enjuagues en PBS las gónadas de cada individuo se cultivaron en paralelo, usando una de ellas como control de la otra. La incubación se realizó en placas de 96 pocillos conteniendo 200 µl de medio de cultivo L-15 cada uno, durante 18h y a 25°C en atmósfera húmeda.

Tanto en el cultivo de gónadas de lubina como en el de pez cebra, tras la incubación, el medio de cultivo se recogió y almacenó a -20°C para analizar el contenido en esteroides posteriormente. El tejido se almacenó a -80°C para la extracción posterior de RNA.

Antes de su uso los inhibidores de PKA (Rp-cAMPs o H89) y el inhibidor de MEK1/2 (PD98059) se disolvieron en el medio de cultivo a la concentración final indicada en cada caso. Los pocillos se pre-incubaron con Rp-cAMPs (1, 5, 10 μ M), H-89 (100 μ M) y PD-98089 (5, 50, 100 μ M) durante 30 min antes de la administración de los estimuladores: scFsh 1x (equivalente a 100 ng/ml), zfFsh (500 ng/ml) o 8Br-cAMPs (10 mM).

6.2.4. Análisis de esteroides

En los experimentos con lubina, los niveles de E2 en el medio de cultivo se evaluaron mediante un EIA competitivo desarrollado en nuestro laboratorio (Moles et al., 2012). Para este ensayo se empleó un anticuerpo primario para E2 producido en conejo y estradiol conjugado con acetilcolinesterasa como trazador (E-AChE, Cayman Chemicals Mi, USA). Los esteroides se extrajeron del medio de cultivo con metanol y 50 μ l de cada muestra se distribuyó en placas de 96 pocillos recubiertos con 150 μ l de anticuerpo anti-conejo producido en ratón a dilución 1:1800. A continuación se distribuyó E-AChE (dilución 1:10 EU/ml) y anticuerpo específico para E2 (1:845000), ambos en un volumen final de 50 μ l. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche y tras varios lavados se distribuyeron 200 μ l de solución de Ellmans. La reacción se llevó a cabo a 20°C en agitación constante durante 2 h y la absorbancia a 405 nm se midió empleando un lector de microplaca. Los niveles de T y 11KT en el medio de cultivo se evaluaron mediante EIA según Rodríguez et al. (2001 y 2005).

En los experimentos con pez cebra, los niveles de E2 y 11KT se cuantificaron mediante radioinmunoensayo (Schulz et al., 1994).

6.2.5. Extracción de RNA y transcripción reversa para PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El RNA de las gónadas cultivadas de lubina se extrajo empleando Tri-Reagent (Molecular Research Center) siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA de las muestras de pez cebra se extrajo usando el kit RNAqueous-Micro (Ambion). La integridad del RNA se determinó mediante gel de agarosa y su pureza/concentración midiendo su absorbancia a

260/280 nm. La síntesis de cDNA se realizó empleando la transcriptasa SuperScript II siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen Corp.) y empleando 2 µg de RNA como molde.

Los cebadores y sondas Taqman para qPCR de los genes de lubina *cyp17a1* y *3βhsd* fueron los descritos en el capítulo 5, tabla 5.2. Los cebadores para *star*, *cyp11β* y *cyp19a1a* fueron los descritos en (Rocha et al., 2009) y para *er2a* y *er2b* los descritos en (Blázquez et al., 2008). Todas las muestras se analizaron por triplicado en placas ópticas de 96 pocillos y con los reactivos QPCR Mix ABgene's AbsoluteTM (Fisher). Las amplificaciones y lecturas se realizaron en una maquina iCycler IQTM (BioRad Laboratories, Inc). Como gen de referencia se usó el de la proteína ribosomal L-13, empleando la reacción validada por (Mitter et al., 2009). La cantidad relativa de mRNA se normalizó con la de *l-13* mediante el método delta-delta (Livak and Schmittgen, 2001).

En el caso del pez cebra se analizó la expresión de los genes *star*, *cyp17a1*, proteína similar a relaxina 3 (*rlx3c*) y el factor de crecimiento gonadal derivado del soma (*gsdf*) (Leal et al., 2009), receptor para el factor de crecimiento insulínico 1a (*igflra*) y 1b (*igfr1b*) (Chet et al., 2010b), receptor de progesterona (*pr*) (Chet et al., 2010b), receptor de andrógeno (*ar*) (van de Waal, et al., 2009), factor de crecimiento similar a insulina 3 (*igf3*) (Morais et al., 2013) y *cyp19a1a*. Las muestras se analizaron por triplicado con un ensayo basado en SYBR Green (Applied Biosystems), en placas ópticas de 96 pocillos y empleando 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems). La cantidad relativa de mRNA se calculó como se describe en Bogerd et al. (2001) y empleando rRNA *18S* (TaqMan gene expression assays; Applied Biosystems) para la normalización.

6.2.6. Análisis estadístico

Los datos se representan como la media±SEM. Los valores se analizaron, tras su transformación logarítmica, mediante ANOVA de dos vías seguido de un análisis de Holm-Sidak con un nivel de significación de $p < 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa Graph Pad Prism 4.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA, <http://www.graphpad.com>).

6.3. Resultados

6.3.1. Evaluación de los inhibidores y activadores de la PKA y las MAPks

Efecto de los inhibidores de la PKA sobre la activación de sitios CRE mediada por Fsh

El tratamiento del clon estable Fshr / pCRE-LUC con el inhibidor de la PKA KT5720 no redujo la actividad luciferasa inducida por la scFsh en ninguna de las dosis o tiempos analizados (Fig. 6.1A y C). De hecho, el único efecto de este inhibidor fue incrementar la actividad luciferasa inducida por scFsh tras 20 h de incubación y a una dosis de 10 μ M. Se observaron resultados similares cuando se utilizó forskolina, un activador de la PKA, en lugar de scFsh para estimular la actividad luciferasa. Transcurridas 1 o 3 h, la forskolina indujo un incremento significativo y dosis dependiente de la actividad luciferasa, (Fig. 6.1B), que en co-tratamiento con KT5720 fue aún mayor. El tratamiento con el análogo del AMPc 8Br-cAMPs (Fig. 6.1D) provocó un incremento relevante de la actividad luciferasa y en presencia del inhibidor Rp-cAMPs ésta se redujo a los niveles basales en todas las dosis usadas. A su vez, Rp-cAMPs también fue capaz de reducir la actividad luciferasa estimulada por la scFsh (Fig. 6.1E). La capacidad de este inhibidor para bloquear la actividad luciferasa se evaluó a distintos tiempos, y se observó que tras 24 horas de co-tratamiento con el estimulador 8Br-cAMPs, la actividad luciferasa retornaba a los niveles basales (Fig. 6.1F).

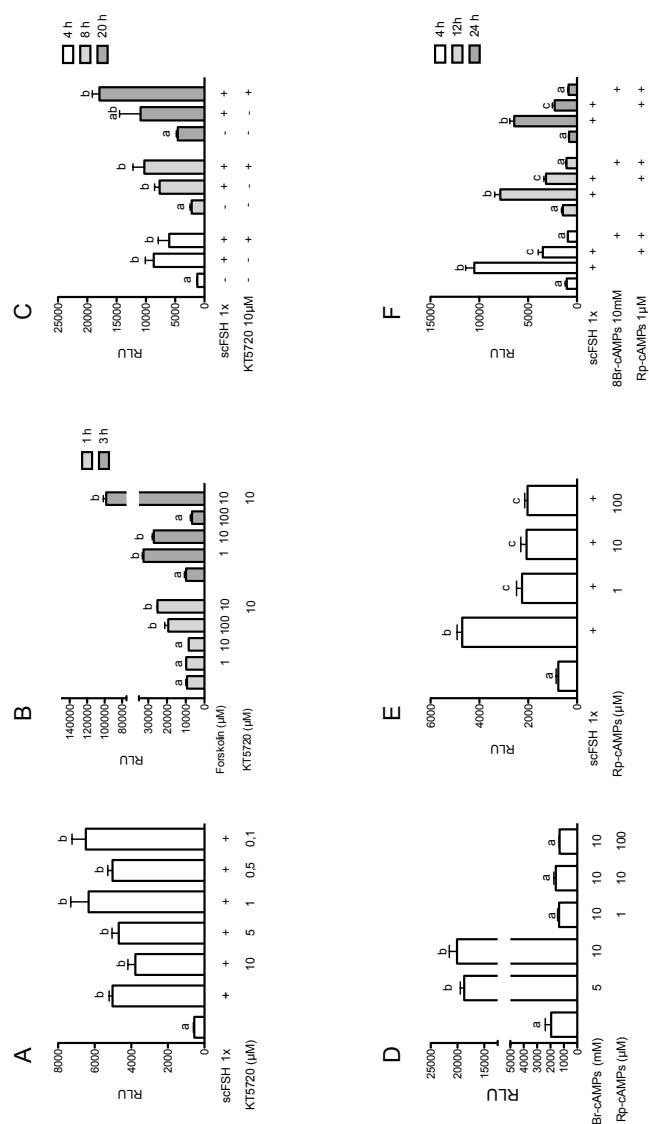


Figura 6.1. Efecto de los tratamientos con KT5720 o Rp-cAMPs sobre los niveles de luciferasa inducidos por forskolina, scFsh o 8Br-cAMPs. **(A)** Respuesta al tratamiento con concentraciones crecientes del inhibidor de la PKA KT5720. Las células se estimularon con scFsh y se co-incubaron con el inhibidor durante 6h. **(B)** Respuesta a distintos tiempos de tratamiento con 10 μM KT5720 en células estimuladas con distintas dosis de forskolina. **(C)** Activación de la actividad luciferasa tras tratamiento con scFsh y a distintos tiempos en presencia del inhibidor de la PKA. **(D)** Efecto del estimulador de la PKA 8Br-cAMPs en la actividad luciferasa y con concentraciones crecientes del inhibidor de PKA, Rp-cAMPs. **(E)** Efecto de Rp-cAMPs sobre la estimulación de la actividad luciferasa generada por scFsh. **(F)** Respuesta temporal al tratamiento con Rp-cAMPs sobre la actividad luciferasa inducida por scFsh o 8Br-cAMPs. La duración de los experimentos fue de 3h cuando el tiempo no se indica. Datos expresados como media±SEM de tres experimentos independientes. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Anova de 1-vía ($P<0.05$).

Efecto del inhibidor de MEK1/2 en la actividad de ERK1/2

Las células HEK-293 del clon estable Fshr / pCRE-LUC se pre-trataron con el inhibidor de MEK 1/2 PD98059 durante 30 min, después de lo cual se incubaron durante otros 30 min con scFsh o 8Br-cAMPs como activadores. Tras un análisis por Western blot con anticuerpos específicos para ERK1/2 fosforiladas (p-ERK1/2), se vio que el tratamiento con scFsh o 8Br-cAMPs incrementaba la fosforilación de ERK1/2 y que en presencia de PD98059 50 μ M la fosforilación de ERK1/2 se reducía en ambos tratamientos al igual que en las células no pre-tratadas con los estimuladores (Fig. 6.2). Estos tratamientos no afectaron a la cantidad total de ERK1/2. Por tanto los cambios detectados en los niveles de p-ERK1/2 son atribuibles a un incremento o a una reducción en la fosforilación de las ERK, y no a la cantidad total de las mismas.

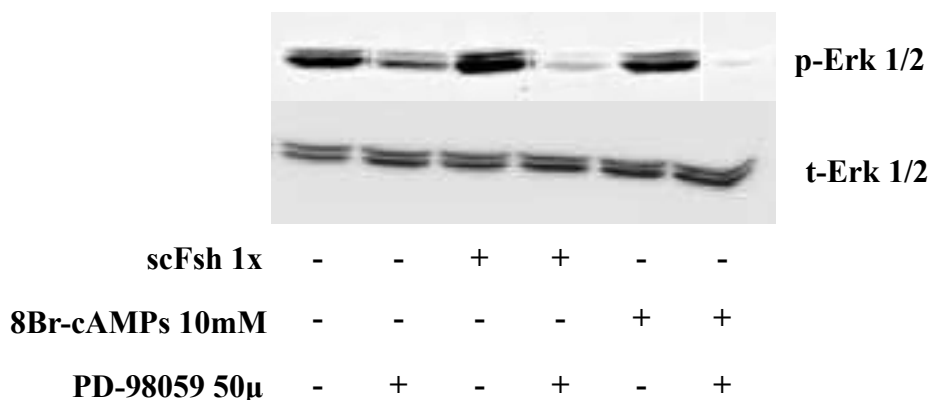


Figura 6.2. Efecto del inhibidor de las MAPks (PD98059) sobre la fosforilación de Erk1/2. Western blot para detección de proteínas Erk 1/2 fosforiladas (p-Erk 1/2) y totales (t-Erk 1/2) en células HEK-293-Fshr incubadas con scFsh 1x, 8Br-cAMPs (100 mM) o PD98059 (50 μ M) durante 30min.

6.3.2. Implicación de la ruta AMPc/PKA en la síntesis de esteroides

Niveles de esteroides en lubina

El tratamiento *in vitro* de ovarios inmaduros de lubina con scFsh no dio lugar a cambios en los niveles de T (Fig. 6.3A). Sin embargo en las muestras tratadas los niveles de E2 aumentaron significativamente. El activador de la PKA, 8Br-cAMPs, tuvo un efecto mayor que la scFsh en la síntesis de esteroides, incrementando 10 veces los niveles de T y 15 veces

los de E2 respecto a los basales (Fig. 6.3A). La presencia del inhibidor de la PKA, Rp-cAMPs, generó una ligera reducción, no significativa, en la síntesis de E2 inducida por scFsh. No se observaron cambios en la producción de T tras el tratamiento con Rp-cAMPs. Por otro lado, este inhibidor fue capaz de abolir drásticamente la estimulación de T generada por 8Br-cAMPs, sin afectar a los niveles de E2.

En el caso del cultivo de testículo de lubina (Fig. 6.3B) el tratamiento con scFsh no provocó cambios ni en los niveles de 11KT ni en los de T. Sin embargo el tratamiento con 8Br-cAMPs incrementó significativamente la liberación de ambos esteroides al medio de cultivo. La presencia de Rp-cAMPs, sola o en combinación con scFsh, redujo los niveles de esteroides sin mostrar evidencias de ser dosis dependiente.

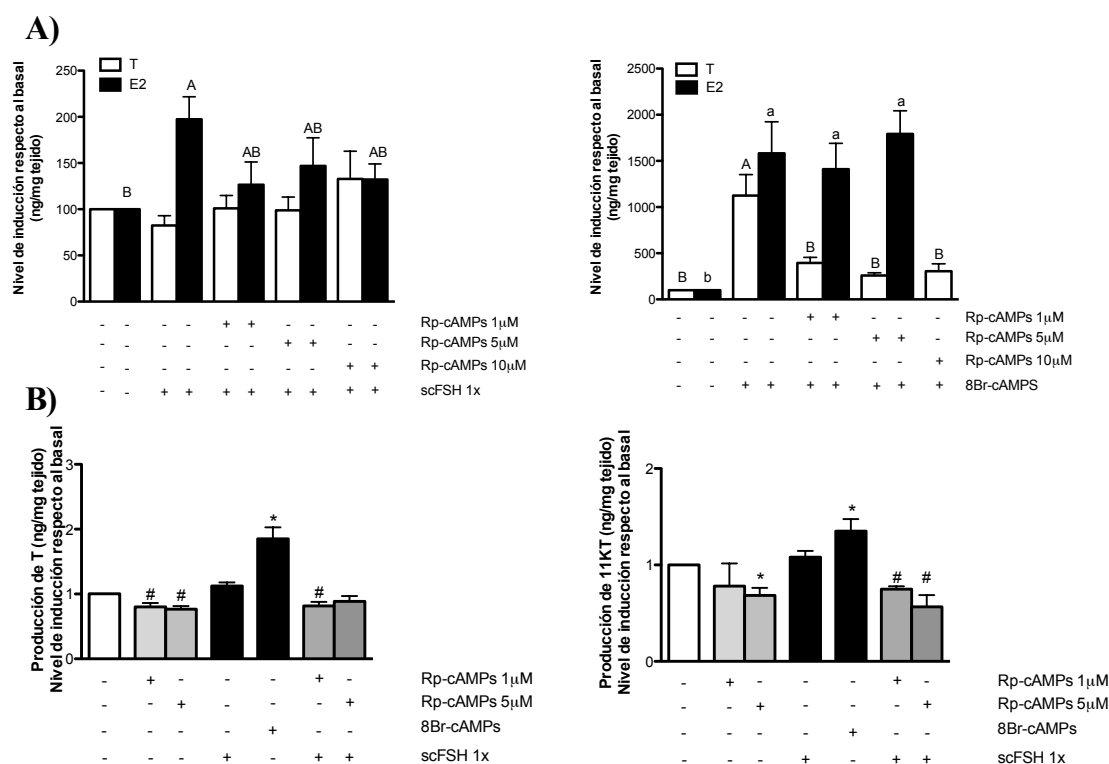


Figura 6.3. (A) Efecto del inhibidor de la PKA (Rp-cAMPs) sobre la producción de T o E2 generados por Fsh (izquierda) o 8Br-cAMPs (derecha) en ovario de lubina medido tras 20 h de cultivo *in vitro*. Los niveles de las muestras control se establecieron como 100. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. (B) Efecto del inhibidor de la PKA (Rp-cAMPs) y del estimulador 8Br-cAMPs sobre los niveles de T (izquierda) y 11KT (derecha) en testículo de lubina medido tras 20 h de cultivo *in vitro*. * indica diferencias significativas respecto al control, # indica diferencias significativas respecto al tratamiento con scFsh. Datos expresados como media±SEM de tres experimentos independientes. Anova de 1-vía ($P<0.05$).

Niveles de esteroides en el pez cebra

El tratamiento de ovario de pez cebra con zfFsh provocó un incremento significativo, respecto a los niveles basales, de la liberación de E2. La adición del inhibidor H89 generó una reducción en los niveles de E2 estimulados por zfFsh (Fig. 6.4A). Tras el tratamiento con zfFsh se detectó un ligero incremento no significativo de los niveles de T, sin cambios relevantes en presencia de H89.

En el cultivo de testículo de pez cebra la zfFsh incrementó de manera significativa los niveles de 11KT, que en presencia de H89 disminuyeron hasta niveles basales (Fig. 6.4B).

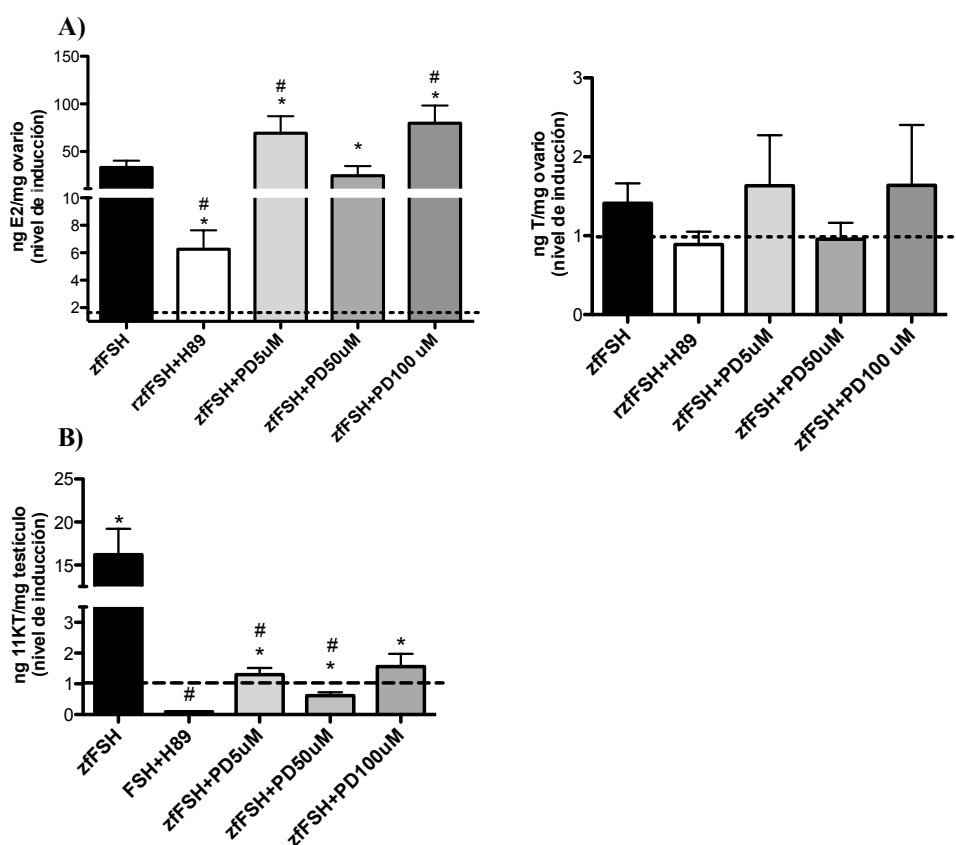


Figura 6.4. (A) Efecto del inhibidor de la PKA H89 y del inhibidor de las MAPks PD98059 sobre los niveles de E2 y T inducidos por Fsh en ovario de pez cebra medido tras 20 h de cultivo. # indica diferencias significativas respecto al tratamiento con zfFsh, * indica diferencias significativas respecto al nivel basal. (B) Efecto del inhibidor de la PKA (H89 100 μ M) y las MAPks (PD98059) sobre los niveles de 11KT inducidos por zfFsh en testículo de pez cebra medido tras 20 h de cultivo. # indica diferencias significativas respecto al tratamiento con zfFsh, * indica diferencias

significativas respecto al nivel basal. La línea punteada cruzando el eje de ordenadas en 1 indica el nivel basal. Datos expresados como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. Anova de 1-vía ($P<0.05$).

6.3.3. Efecto de la inhibición de MEK1/2 sobre los niveles de esteroides estimulados por scFsh o 8Br-cAMPs

Implicación de MEK 1/2 en la síntesis de esteroides en la lubina

En el cultivo de ovario de lubina, el inhibidor PD98089 redujo los niveles basales de T a la mitad sin afectar a los de E2 (Fig. 6.5). Al igual que en los experimentos anteriores la scFsh fue más eficiente induciendo la producción de E2 que de T. La estimulación de E2 por parte de la scFsh fue parcialmente atenuada en presencia de PD98059 50 μ M y en presencia de este inhibidor los niveles de T disminuyeron por debajo de los niveles basales.

El inhibidor PD98059 fue muy eficaz bloqueando de manera dosis dependiente la estimulación de T y E2 inducida por 8Br-cAMPs (Fig. 6.5) y 50 μ M fue la dosis más eficiente. En los cultivos de testículo, no se observaron cambios relevantes en los niveles de 11-KT debidos a los tratamientos (resultados no mostrados).

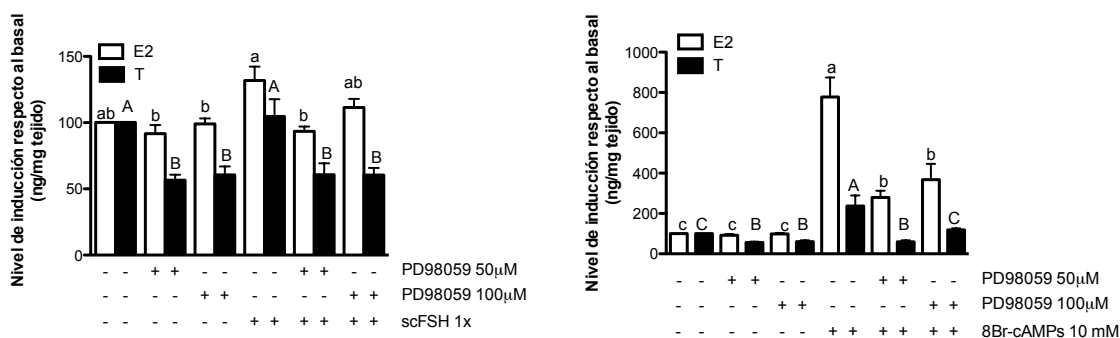


Figura 6.5. Efecto del inhibidor de las MAPks PD98059 sobre los niveles de E2 y T inducidos por scFsh o 8Br-cAMPs en ovario de lubina medido tras 20 h de cultivo. Datos expresados como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Anova de 1-vía ($P<0.05$).

Implicación de MEK 1/2 en la síntesis de esteroides en el pez cebra

El tratamiento de ovarios de pez cebra con PD98059 no redujo los niveles de E2 estimulados por zFsh (Fig. 6.4A). Los diferentes tratamientos no afectaron a los niveles de T.

El tratamiento de testículos de pez cebra con PD98059 provocó una reducción significativa de los niveles de 11KT inducidos por zFsh, que fue máxima con la dosis de 50 μ M (Fig. 6.4B).

6.3.4. Efecto de la inhibición de la ruta de AMPc/PKA sobre la expresión génica

Expresión génica en lubina

A pesar de que el tratamiento de ovario de lubina con scFsh tuvo un efecto reducido sobre la liberación de esteroides, principalmente en los niveles de T, si se produjeron cambios importantes en la expresión de genes codificantes de enzimas esteroideogénicas (Fig. 6.6). La scFsh provocó un incremento significativo de los niveles de mRNA de *star* que no se redujeron al inhibir la ruta AMPc/PKA. El tratamiento con 8Br-cAMPs mostró un perfil similar, pero en este caso la expresión de *star* se redujo significativamente, de manera dosis dependiente, en presencia del inhibidor de la PKA. La expresión del gen de la aromatasa *cyp19a1a* también se incrementó tras el tratamiento con scFsh o 8Br-cAMPs. Sin embargo el Rp-cAMPs solo fue capaz de bloquear la estimulación de *cyp19a1a* inducida por 8Br-cAMPs y con la dosis más alta (10 μ M). Ambos tratamientos, scFsh y 8Br-cAMPs, incrementaron la expresión de *3 β hsd* comparado con los niveles basales, y ninguna de las dosis de Rp-cAMPs bloqueó su expresión. Tras la estimulación con scFsh, los transcritos de *cyp17a1* se incrementaron de forma significativa, pero no tras el tratamiento con 8Br-cAMPs y además, tras la inhibición de la PKA con Rp-cAMPs éstos no se redujeron. En cuanto a la expresión de los receptores de estrógenos, tanto la scFsh como el 8Br-cAMPs incrementaron de manera significativa los niveles de *er2a* pero el tratamiento con el inhibidor Rp-cAMPs no tuvo efecto alguno. Ninguno de los tratamientos afectó a los niveles de expresión de *er2b*.

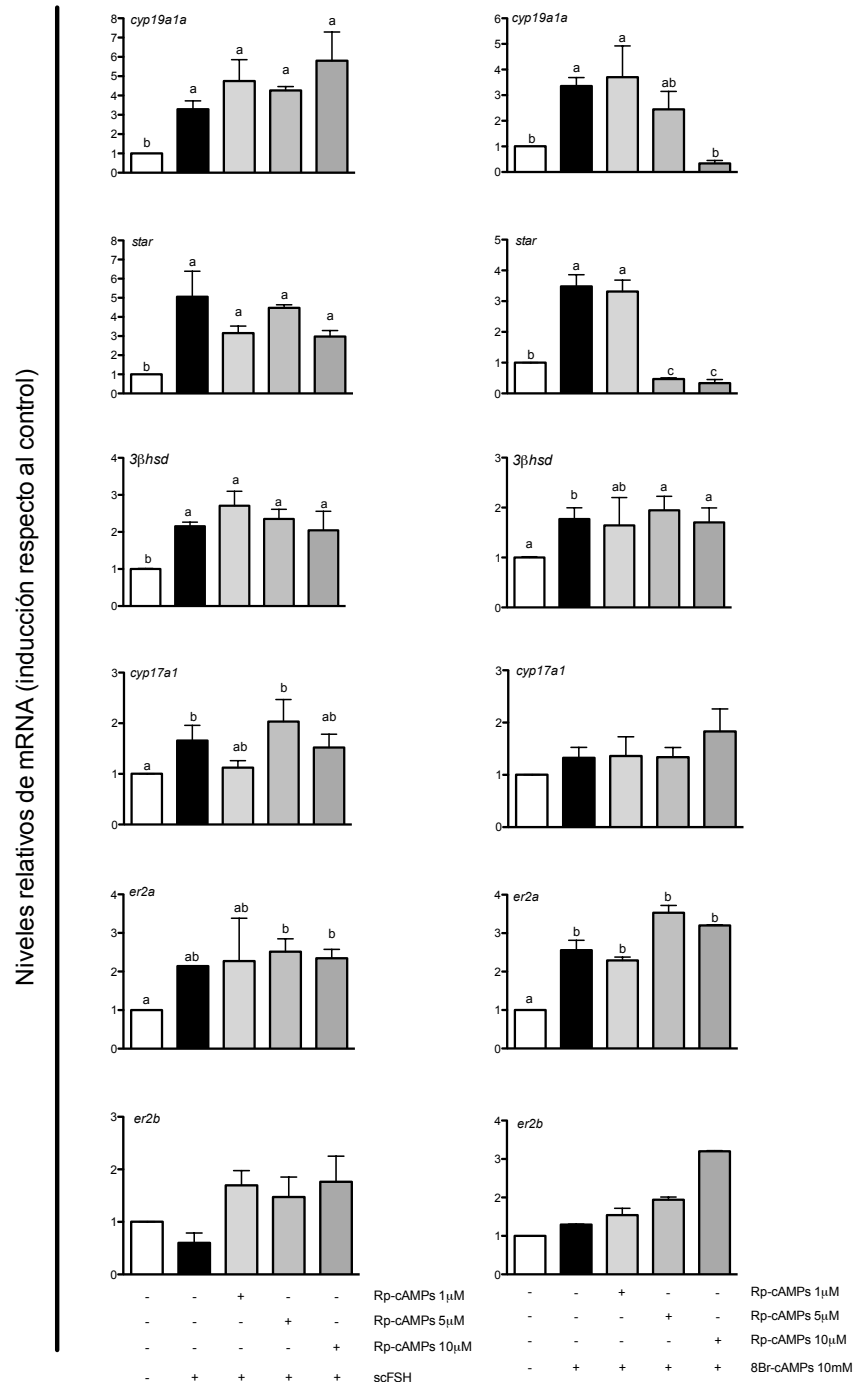


Figura 6.6. Efecto de la inhibición de la ruta de la PKA con Rp-cAMPs en la expresión génica en ovario de lubina tras 20 h de co-tratamiento con scFsh o 8Br-cAMPs. Datos expresados como media±SEM de tres experimentos independientes. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Anova de 1-vía ($P < 0.05$).

Tanto la scFsh como el 8Br-cAMPs estimularon los niveles de expresión de *star*, *3βhsd* y *cyp17a1* en los cultivos de testículo de lubina (Fig. 6.7). En presencia de Rp-cAMPs los

niveles de mRNA de todos estos genes se redujeron. Sin embargo, en el caso del gen *cyp11 β* ninguno de los tratamientos provocó cambios significativos de sus niveles de expresión.

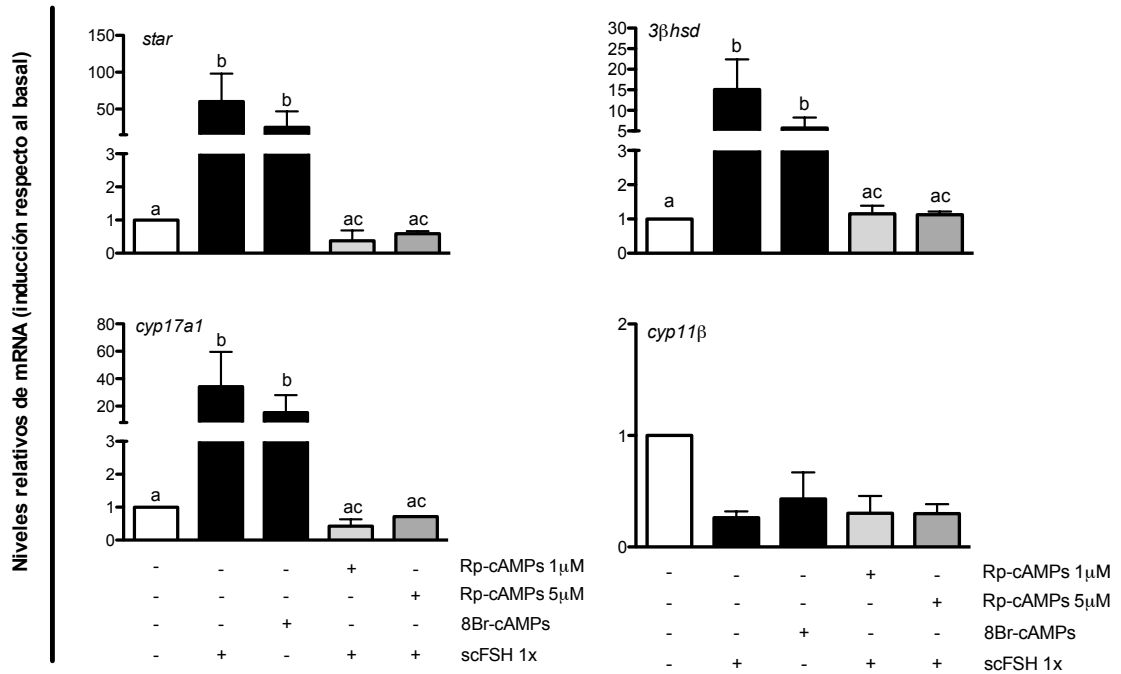


Figura 6.7. Efecto de la inhibición de la ruta de la PKA con Rp-cAMPs en la expresión génica en testículo de lubina tras 20 h de tratamiento con scFsh o 8Br-cAMPs. Datos expresados como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Anova de 1-vía ($P < 0.05$).

Expresión génica en el pez cebra

El cultivo de ovario de pez cebra tratado con zfFsh mostró un incremento significativo en la expresión de genes que codifican enzimas esteroidogénicas tales como *star*, *cyp19a1a* y *cyp17a1* (Fig. 6.8A). La presencia del inhibidor de la PKA H89 redujo de manera significativa los niveles de mRNA de todos estos genes. También se evaluaron cambios en otros genes gonadales que ya se habían descrito como diana de la acción de la Fsh en testículos de pez cebra (García-López et al., 2010). En presencia de zfFsh se detectó un incremento significativo en la expresión de *igf3*, pero no se observó ningún efecto en la expresión de *rlx3c* o *pr*. Sin embargo, el co-tratamiento con H89 redujo de manera significativa la expresión de *pr* y de *rlx3* por debajo de los valores basales.

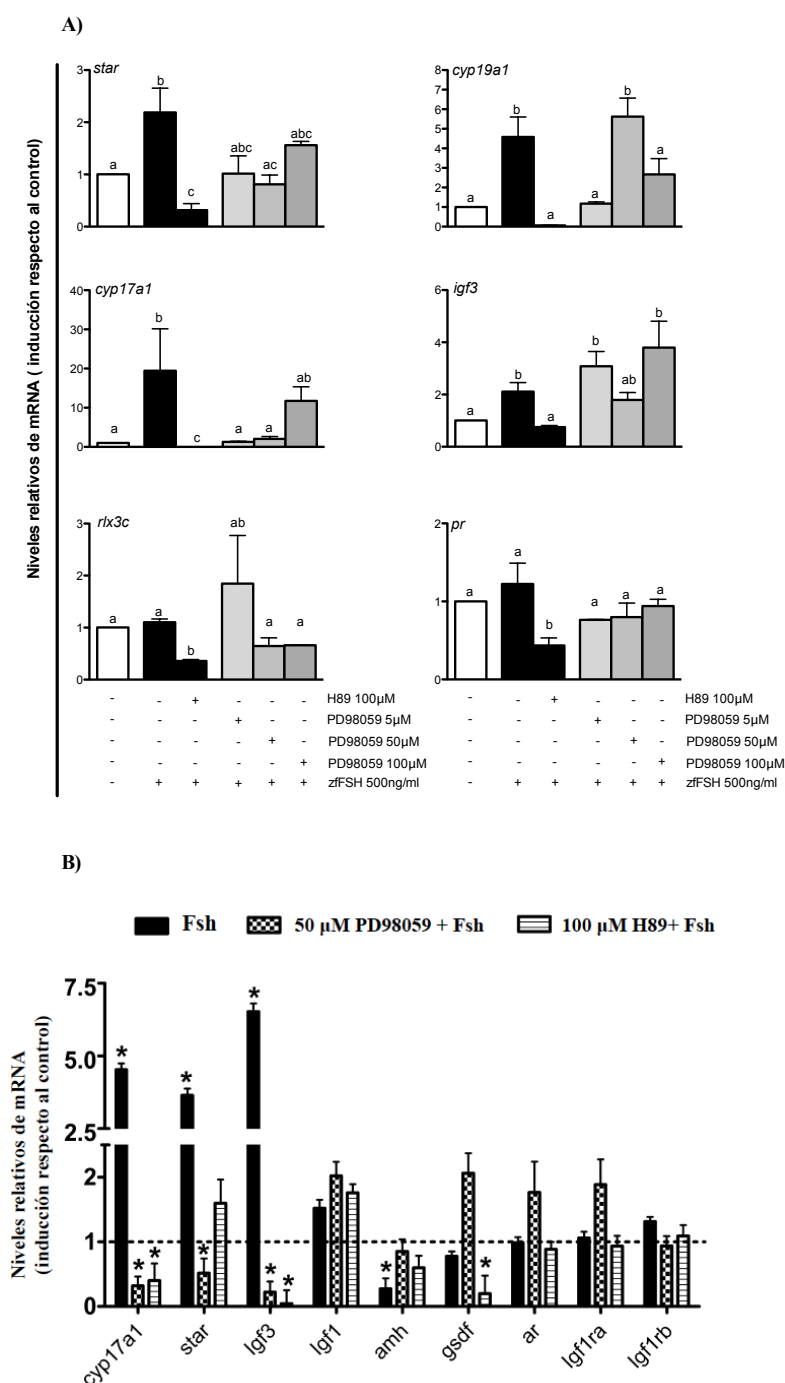


Figura 6.8. Efecto de la inhibición de la ruta de la PKA o las MAPKs en la expresión génica en ovario (A) y testículo (B) de pez cebra tras 20 h de co-tratamiento con zFSh. Datos expresados como media $\pm$ SEM de tres experimentos independientes. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos, * indica diferencias significativas respecto al nivel basal. Anova de 1-vía ($P < 0.05$).

El tratamiento de testículos de pez cebra en cultivo con zFSh (Fig. 6.8B) indujo un incremento significativo de los niveles de mRNA de *cyp17a1*, *star* y *igf3*. En presencia de

H89 los niveles de *cyp17a1* y de *igf3* se redujeron por debajo de su nivel basal. La expresión de *star* también disminuyó. En presencia de zFsh también disminuyeron significativamente los niveles de transcritos de *amh*, y cuando se añadió H89 en el cultivo estos niveles se mantuvieron por debajo de los valores basales sin llegar a ser significativamente diferentes. A pesar de que el tratamiento con zFsh no modificó los niveles de mRNA de *gsdf* el tratamiento con H89 provocó su disminución. Los niveles de *igf1*, *igf1ra*, *igf1rb* y *ar* no se alteraron como consecuencia de los tratamientos.

6.3.5. Efecto de la inhibición de MAPk en la expresión génica

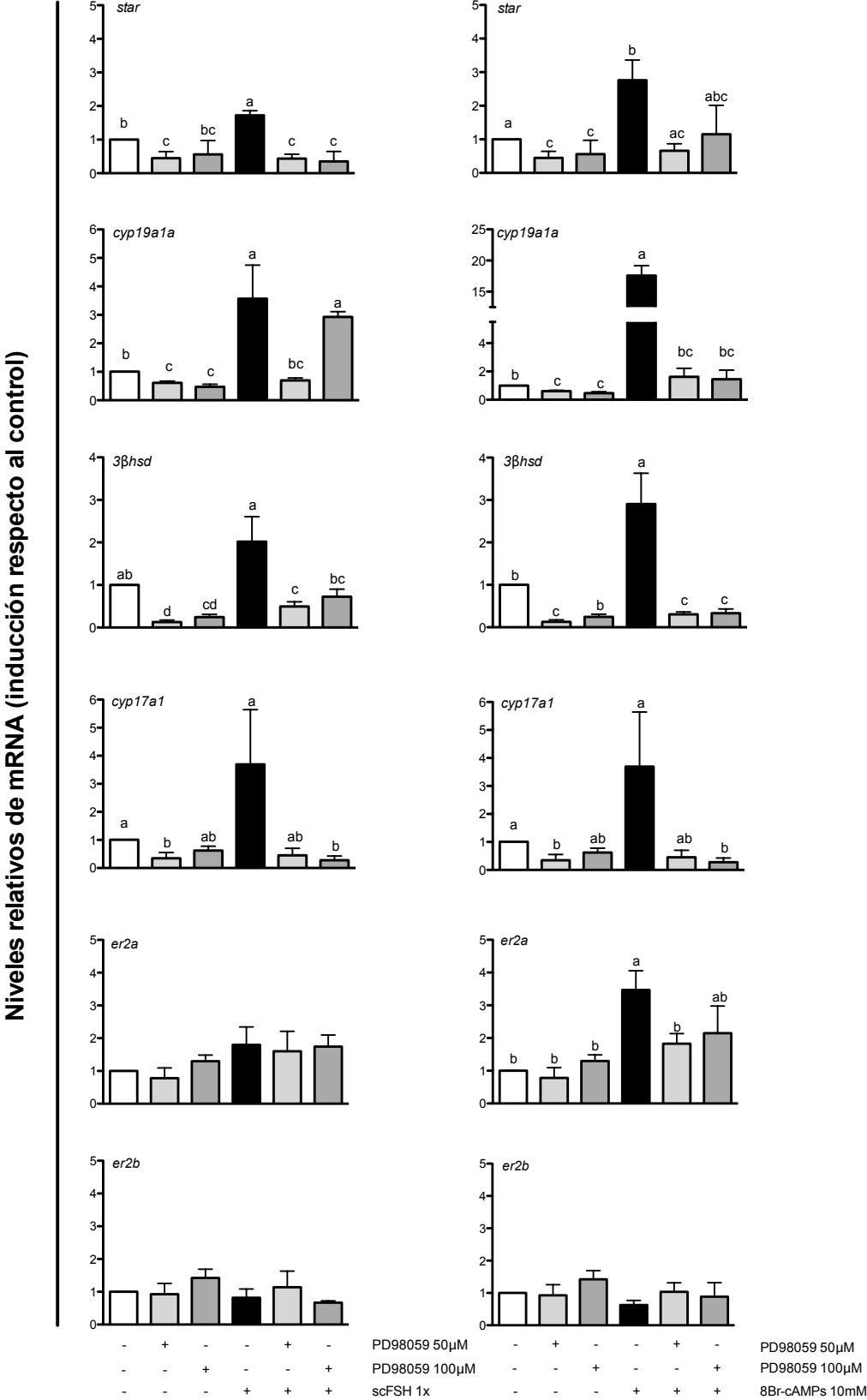
Expresión génica de lubina

El bloqueo de MEK1/2 con PD98059 tuvo un impacto significativo en la expresión de los cuatro genes codificantes de enzimas esteroidogénicas medidos en el ovario de lubina (Fig. 6.9A). El tratamiento con scFsh generó un incremento importante de los transcritos de *star*, *cyp19a1a*, *3 β hsd* y *cyp17a1*. La presencia de PD98059 bloqueó esta estimulación generada por scFsh. El tratamiento con 8Br-cAMPs proporcionó un perfil similar al de la scFsh, incrementando la expresión de esas enzimas esteroidogénicas y disminuyendo sus niveles cuando el tratamiento se combinó con PD98059.

El tratamiento con scFsh, sólo o en combinación con PD98059, no tuvo efecto sobre la expresión de *er2a* y *er2b*. Sin embargo, la inhibición de MEK1/2 generó una reducción importante de los niveles de mRNA de *er2a* estimulados por 8Br-cAMPs, pero no en los de *er2b*.

El tratamiento *in vitro* de testículo de lubina con scFsh provocó un incremento significativo de la expresión de *star* y *cyp17a1*, que se bloqueó en presencia de PD98059 (Fig. 6.9B). La expresión de *3 β hsd* y *cyp11 β* también aumentó tras el tratamiento con scFsh, y disminuyó con el inhibidor PD98059, aunque estas variaciones no resultaron significativas tras el tratamiento estadístico.

A)



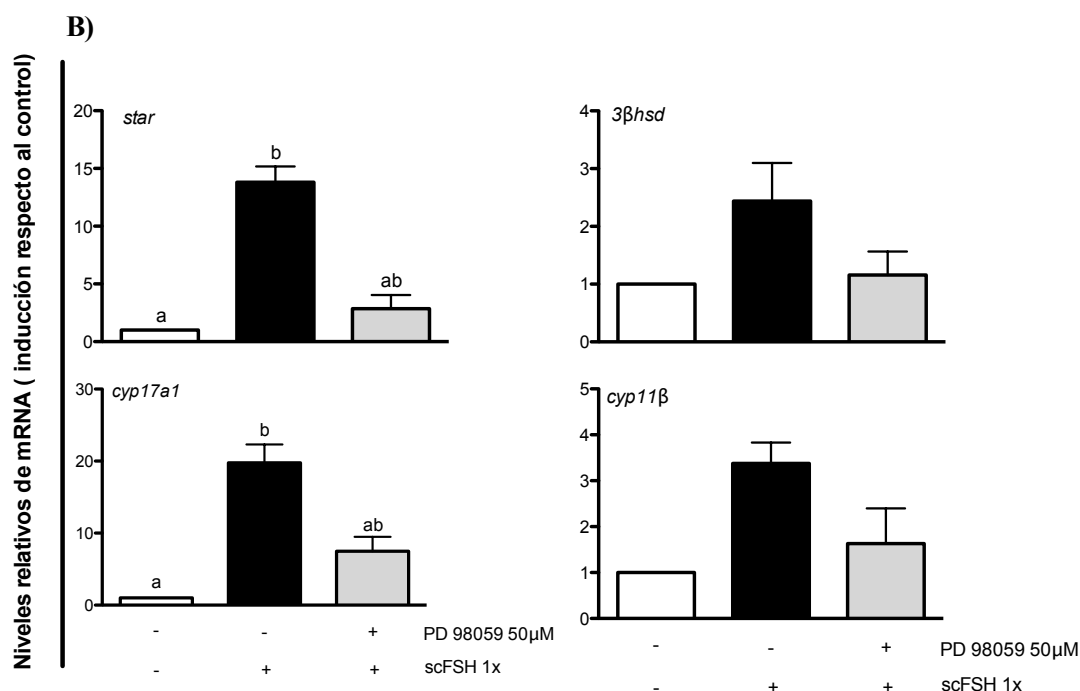


Figura 6.9. Efecto de la inhibición de la ruta de las MAPks con PD 98059 en la expresión génica en ovario (A) y testículo (B) de lubina tras 20 h de co-tratamiento con scFsh o 8Br-cAMPs. Datos expresados como media±SEM de tres experimentos independientes. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. Anova de 1-vía ($P < 0.05$).

Expresión génica en pez cebra

En el cultivo de ovario de pez cebra (Fig. 6.8A) la expresión de *star*, *cyp19a1a*, y *cyp17a1* inducidas por zFsh se redujeron de manera significativa en presencia de PD98059. Tras el tratamiento con zFsh también se incrementó la expresión de *igf3* pero el tratamiento con PD98059 no la reprimió. No se observaron cambios importantes en la expresión de *pr* o *rlx3c*.

En los cultivos de testículo de pez cebra (Fig. 6.8B) el inhibidor de la MAPk redujo de manera significativa los transcritos de *cyp17a1*, *star* y *igf3* inducidos por zFsh. La combinación de tratamientos de zFsh con PD98059 incrementó la expresión de *igf1*, *gsdf*, *ar* y *igfra* respecto a los niveles basales aunque no de manera significativa. No se detectaron cambios en los transcritos de *amh* y *igf1rb*.

6.3.6. Efecto de la inhibición de PKA y MEK en la fosforilación de ERK1/2

Con el fin de evaluar cómo afectan las inhibiciones de la PKA y MEK a la fosforilación de ERK1/2, se trataron células HEK-293 del clon estable del Fshr de lubina con los inhibidores Rp-cAMPs o PD98059, y con scFsh o 8Br-cAMPs como activadores. Se realizó un Western blot para cuantificar la cantidad de proteína ERK1/2 total y fosforilada (Fig. 6.10). Los tratamientos con scFsh y 8Br-cAMPs estimularon la fosforilación de las proteínas ERK1/2 respecto a los niveles basales. El bloqueo de la ruta de la PKA con Rp-cAMPs, solo o en combinación con scFsh o 8Br-cAMPs, no redujo el nivel de ERK1/2 fosforiladas. De hecho, la inhibición de la PKA provocó un incremento de la fosforilación de ERK1/2. El tratamiento con PD98059 redujo los niveles basales de p-ERK1/2 y bloqueó la fosforilación en las muestras estimuladas con scFsh o 8Br-cAMPs. Ninguno de los tratamientos modificó la cantidad total de ERK1/2.

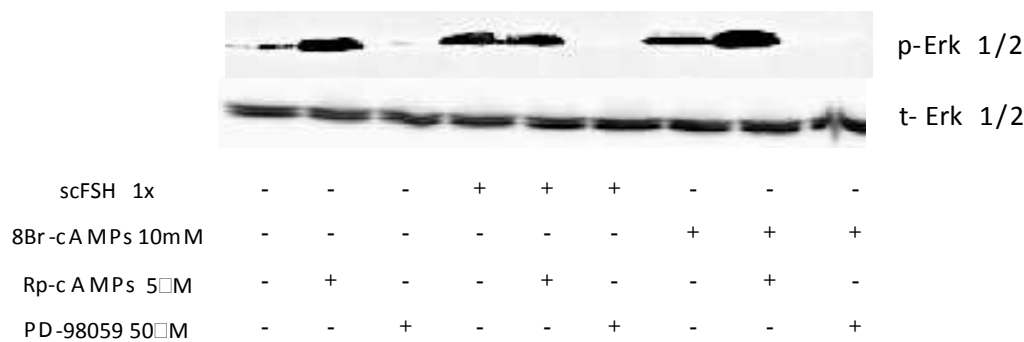


Figura 6.10. Efecto de la inhibición de la ruta de la PKA o las MAPks en la fosforilación de Erk1/2. Las células HEK-293-Fshr se preincubaron con Rp-cAMPs o PD98059 y se trataron con scFsh o 8Br-cAMPs durante 30 min.

6.4. Discusión

La gonadotrofina Fsh es la principal señal iniciadora de la maduración gonadal y ejerce su acción activando la síntesis de esteroides (Schulz et al., 2010; Schulz y Miura, 2002). En el caso de la lubina y del pez cebra, las dos especies estudiadas en este capítulo, la actividad esteroidogénica de la Fsh ya se ha demostrado previamente (García-López et al., 2010; Molés et al., 2008a). En este capítulo describimos por primera vez en la lubina, y detallamos más en el pez cebra, la implicación de la ruta AMPc/PKA en el proceso de esteroidogénesis.

Adicionalmente, demostramos que la ruta de las MAPks también ejerce un control importante en este proceso en ambas especies.

La estimulación de los cultivos gonadales con Fsh generó un incremento en la liberación de esteroides al medio de cultivo en ambas especies. Además, en el caso del cultivo de gónadas de lubina, se empleó el análogo específico del AMPc, 8Br-cAMPs, el cual provocó un efecto más potente que el de la Fsh en la síntesis de esteroides, algo que confirma que este proceso está mediado por la ruta AMPc/PKA. Estos resultados coinciden con los ya descritos en otras especies de peces como la trucha arcoíris (Planas et al., 1997), corvina (Benninghoff and Thomas, 2006), y carpa común (Paul et al., 2010). El bloqueo en la liberación de esteroides mediante el inhibidor de AMPc/PKA (Rp-cAMPs) ha demostrado la implicación de esta vía de señalización en la mediación de la acción de la Fsh, excepto en el caso de ovario de lubina, donde la liberación de E2, inducida por la Fsh o el 8Br-cAMPs, no se vio afectada. Esto refleja la presencia de otras rutas diferentes a la AMPc/PKA en la regulación de la esteroidogénesis.

A continuación pretendimos comprender cómo activa la Fsh el proceso de síntesis de esteroides desde el punto de vista de la expresión génica, para lo cual estudiamos la acción de esta GtH en la expresión de varios genes implicados en el proceso de esteroidogénesis. La acción de la proteína StAR inicia la biosíntesis de esteroides regulando el transporte de colesterol al interior de la mitocondria. Esta proteína es por lo tanto uno de los reguladores claves de este proceso, de hecho mutaciones en el gen *StAR* generan patologías endocrinas significativas, como la hiperplasia adrenal lipoide congénita (Clark y Stoco, 1996). En el presente capítulo encontramos que tanto la Fsh como el 8Br-cAMPs regulan de manera positiva la transcripción de *star*, independientemente de la especie y/o el sexo estudiado. La inducción de *star* mediante 8Br-cAMPs en lubina y su inhibición con H89 en pez cebra coinciden con trabajos previos en los que se describe que la expresión y la actividad de la proteína StAR es dependiente de la ruta AMPc/PKA (Pescador et al., 1997; Manna et al., 2003a; Balasubramanian et al., 2008). De forma similar a lo que ocurre con *star*, se han identificado sitios CRE en el promotor de *cyp19a1a* en el pez cebra (Tong y Chung, 2003) y en la lubina (Galay-Burgos et al., 2004), lo que indica que la ruta AMPc/PKA está implicada en regulación de la expresión de este gen. En el cultivo de ovario de lubina, tras el tratamiento con Fsh o 8Br-cAMPs, se detectó un incremento significativo en la expresión de *cyp19a1a*. Esta estimulación se bloqueó eficientemente en presencia de Rp-cAMPs en las muestras

estimuladas con 8Br-cAMPs, pero no en las estimuladas con Fsh. Estos resultados son similares a lo detectado en la expresión de *star*, lo cual puede indicar que la Fsh estaría estimulando la esteroidogénesis mediante otras rutas de señalización adicionalmente a la ruta AMPc/PKA. En el caso del pez cebra, la expresión de *cyp19a1a* se bloqueó completamente tras el tratamiento con H89, demostrando que su regulación se ejerce fundamentalmente mediante la vía AMPc/PKA.

P450c17a1 o Cyp17a1 es la enzima responsable de la síntesis de E2 en el ovario y de la 11KT en el testículo, mientras que la enzima Cyp17a2 se requiere para la síntesis de hormonas inductoras de la maduración (Zhou et al., 2007a). Teniendo en cuenta esta información y los trabajos previos realizados en la anguila japonesa (Kazeto et al., 2008) y en el pez cebra (García-López et al., 2010; Skaar et al., 2011), consideramos que *cyp17a2* no era un gen relevante en este estudio, ya que partíamos de hembras en estado pre-vitelogénico y machos inmaduros. Respecto a *cyp17a1*, la Fsh incrementó significativamente la expresión de esta enzima en ambas especies y en ambos sexos, siendo esta expresión modulada por la acción de los inhibidores de AMPc/PKA. En el caso de mamíferos, hay evidencias claras de que la estimulación de AMPc/PKA por parte de la Fsh o del 8Br-cAMPs activa, mediante fosforilación, al receptor nuclear del SF-1, lo que promueve la transcripción de *cyp17a1* mediante la unión a su promotor (Zhang y Mellon, 1996).

La enzima 3 β HSD es clave para la síntesis de testosterona, ya que cataliza la síntesis de androstenediona, el precursor inmediato de la testosterona. En mamíferos la regulación de este gen está bajo el control de la LH (Keeney y Mason, 1992). Sin embargo, hemos encontrado que en lubina la scFsh también es capaz de incrementar la transcripción de 3 β hsd, de manera similar a lo que sucede en la anguila japonesa (Kazeto et al., 2008), salmón coho (Luckenbach et al., 2011) y trucha arcoíris (Sambroni et al., 2013). El promotor de 3 β HSD está poco caracterizado en humanos (Parthasarathy y Balasubramanian, 2008) y por el momento se ha descrito la presencia de elementos de respuesta a andrógenos, proponiéndose que unos niveles normales o altos de T podrían inhibir la transcripción del gen 3 β HSD. En el caso del cultivo de ovario de lubina hemos detectado un incremento en la producción de T tras la estimulación con 8Br-cAMPs, que se redujo en presencia del inhibidor Rp-cAMPs sin observar a la vez cambios en la expresión de 3 β hsd. Por otro lado, en los cultivos de ovario y testículo de lubina estimulados con scFsh no detectamos cambios en los niveles de T, sin embargo la transcripción de 3 β hsd si que aumentó. Por lo tanto, los resultados presentados en

este capítulo no apoyan que la T ejerza una regulación sobre la expresión de *3 α hsd* en lubina, tal y como se sugiere en el caso de los humanos. Tampoco podemos concluir que la expresión de *3hsd* se encuentre controlada por la ruta AMPc/PKA, ya que el incremento en su expresión inducido por scFsh se redujo en presencia de Rp-cAMPs en los cultivos de testículo de lubina, pero no en el caso del cultivo de ovario. Sería por lo tanto necesario caracterizar en peces el promotor de este gen para poder comprender plenamente como se regula su expresión.

Los resultados descritos anteriormente muestran como la Fsh puede emplear diferentes rutas para transmitir su señal (Ulloa-Aguirre et al., 2007; Hunzicker y Maizels, 2006). En este capítulo demostramos como el inhibidor de MEK 1/2, PD98059, altera la producción de esteroides en las gónadas tratadas, y se observan diferencias dependiendo del tipo de esteroide analizado, la especie y el sexo. La ruta de las MAPks parece tener un papel importante en el control de la esteroidogénesis tanto en mamíferos (Gyles et al., 2001; Poderoso et al., 2008) como en peces (Benninghoff and Thomas, 2006; Paul et al., 2010). Hay trabajos previos en peces que demuestran que la producción de T y E2 inducida por hCG puede reducirse a sus niveles basales en presencia de PD98059 (Benninghoff and Thomas, 2006). En este trabajo, la inhibición de la señalización de las MAPks generó, de manera general, una reducción en la expresión de genes codificantes de enzimas esteroidogénicas, con un efecto mucho más potente que el generado tras inhibir la ruta AMPc/PKA. El bloqueo de MEK1/2 con PD98059 disminuyó la expresión de *star* inducida por scFsh de manera similar a lo que ya se ha descrito en otras especies (Gyles et al., 2001; Martinelle et al., 2004; Poderoso et al., 2008), donde ERK1/2 y su activador MEK1/2 activan el factor de transcripción que regula la expresión de *Star* y por lo tanto el tráfico de colesterol al interior de la mitocondria (Martinelle et al., 2004), condicionando el proceso de síntesis de esteroides. De manera similar a *star*, la expresión de *cyp17a1* se incrementó significativamente tras el tratamiento con scFsh, y se suprimió en presencia de PD98059 en ambas especies y en ambos sexos. Se ha descrito que la inhibición de las MAPks también suprime la expresión de *cyp17a1* inducida por Lh en células de la teca bovina (Fukuda et al., 2009). Teniendo en cuenta estos resultados podemos concluir que la señalización de las MAPks ejerce un control estricto sobre la expresión de *star* y de *cyp17a1*, estando esta regulación conservada entre especies y sexos.

La síntesis de esteroides también está bajo el control de factores reguladores locales producidos por células somáticas de la gónada (células de Sertoli en el caso del testículo, o de la granulosa en el caso del ovario) en respuesta a la estimulación con Fsh. En este capítulo hemos estudiado dos de estos factores que previamente se habían descrito como relevantes en el pez cebra (Chen et al., 2013; Skaar et al., 2011). Hemos observado que el tratamiento de gónadas de pez cebra con zFsh estimuló la expresión de *igf3*, un factor de crecimiento específico en teleósteos y que se expresa sólo en gónadas (Wang et al., 2008b). Estos resultados, junto con la estimulación de la expresión de *igf3* en el ovario de pez cebra tras el tratamiento con hCG descrita por Li y colaboradores (Li et al., 2011), y más recientemente en testículos de trucha arcoíris tras el tratamiento con Fsh (Sambroni et al., 2013), evidencian que la expresión de *igf3* tiene una regulación endocrina y probablemente mediada por la ruta AMPc/PKA. En este trabajo, el bloqueo de la ruta AMPc/PKA redujo significativamente los niveles de expresión de *igf3*, en línea con la inducción encontrada en ovarios de pez cebra tratados con 8Br-cAMPs (Li et al., 2011). Adicionalmente, se han descrito sitios CRE en el promotor de *igf3* en el pez cebra (Li et al., 2011). Otro factor paracrino producido por las células de Sertoli y estudiado en el pez cebra es la Amh. El tratamiento de testículos de pez cebra con zFsh generó un incremento en la producción de 11KT, detectándose de manera simultánea una reducción en la expresión de *amh*, lo que coincide con trabajos previos realizados también en esta especie (Skaar et al., 2011). De manera opuesta a los otros genes analizados, en el caso de la *amh*, el bloqueo de las rutas AMPc/PKA o MAPk no afectó a su expresión. Hay que tener en cuenta que la Fsh ejerce una acción principalmente represiva sobre la expresión de *amh*, algo totalmente opuesto a los otros genes estudiados en este capítulo, por lo tanto una tercera vía de señalización, diferente a las dos aquí estudiadas, podría estar ejerciendo esta función represiva sobre la expresión de *amh*.

Tanto en la lubina como en el pez cebra, la estimulación de los cultivos de ovario con Fsh generó un incremento en los niveles de E2. Los estrógenos ejercen su acción mediante la unión a receptores de estrógenos (ER) que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (Laudet et al., 1992). Los ERs actúan en el núcleo activando la transcripción de genes mediante la unión a elementos de respuesta a estrógeno (ERE) presentes en sus promotores (Pasapera et al., 2005). En los peces teleósteos se han descrito tres tipos de ERs, denominados Er1, Er2a y Er2b, codificados por tres genes diferentes, siendo la expresión de *er2b* predominante en el ovario de lubina (Halm et al., 2004) y en el de pez cebra (Lassiter et al., 2002). En el cultivo de ovario de lubina, la estimulación con scFsh o 8Br-cAMPs

incrementó los niveles de mRNA de *er2a*, correlacionado con los niveles de E2 detectados en el medio de cultivo; sin embargo los niveles de *er2b* permanecieron inalterados. Adicionalmente, el bloqueo de la ruta de las MAPks tras el tratamiento con 8Br-cAMPs redujo los niveles de E2 inducidos por el análogo, y, generó una reducción significativa en la expresión de *er2a* pero no en la de *er2b*. Estos resultados indican que en nuestras condiciones experimentales la transcripción de *er2a* podría estar influenciada por la presencia de E2, sugiriendo una auto-regulación (Sabo-Attwood et al., 2004), ya que sólo tras la reducción de los niveles de E2, mediante la inhibición de MEK1/2, se detectó una modulación de los niveles de mRNA de *er2a*. Estos resultados parecen indicar que el E2 regula la expresión de *er2a* y *er2b* de manera diferente, tal y como se ha descrito en el carpín dorado (Soverchia et al., 2005).

Otro receptor nuclear también implicado en la transducción de la señal esteroideogénica es el receptor de andrógenos (AR). El AR interactúa con los elementos de respuesta a andrógenos (ARE) que están presentes en los promotores de genes diana de andrógenos (Lee and Chang, 2003b), generando su trans-activación. En este capítulo hemos estudiado la expresión de este receptor en el testículo del pez cebra, confirmando los resultados obtenidos por (García-López et al., 2010) que mostraban que la expresión del *ar* no está condicionada por el tratamiento con Fsh, a pesar del fuerte incremento en los niveles de 11KT que estimula esta hormona, o por el bloqueo en las rutas AMPc/PKA o MAPk. Lee y Chang (2003a) también han descrito que la expresión del *AR* en humanos está bajo el control de sitios CRE, sin embargo en otros mamíferos no se han identificado sitios CRE en el promotor del *ar*. Por otro lado, se ha descrito en humanos que una exposición prolongada a andrógenos genera una reducción en los transcritos de *AR* y una pérdida progresiva de la sensibilidad a andrógenos (Wolf et al., 1993). Sin embargo, en base a nuestros resultados, esta regulación en la expresión del *ar* dependiente de andrógenos parece ausente en peces. No obstante una mejor caracterización del promotor del *ar* en el pez cebra podría ayudar a entender la regulación de este gen.

Analizando la relación entre las rutas AMPc/PKA y MAPk hemos detectado que tanto la estimulación con scFsh como con 8Br-cAMPs produce un incremento en la fosforilación de ERK1/2. Sin embargo, cuando se inhibió la ruta AMPc/PKA con Rp-cAMPs no se detectó una reducción en la fosforilación de las ERKs, lo que indica que las MEK1/2 no son una diana directa de AMPc/PKA. Tan solo el inhibidor PD98059 fue capaz de reducir la

fosforilación de ERK1/2. La mayoría de los efectos generados por el AMPc están mediados por la PKA, pero el AMPc también puede actuar de forma independiente de la PKA. Se ha descrito que el AMPc también activa las proteínas Epac1 y Epac2 (*Exchange proteins activated by cAMP*), que activarán rápidamente a Rap1 (de Rooij et al., 1998) y al resto de la cascada de las ERK (Stork and Schmitt, 2002). Así pues, nuestros resultados sugieren que en esta situación la regulación de las MAPks podría ser independiente de la PKA, en claro contraste a lo que se ha observado en otras especies (revisado en (Goldsmith and Dhanasekaran, 2007)). De hecho, en la literatura se pueden encontrar resultados contradictorios en cuanto a la interacción entre la ruta PKA y la ruta MAPk (revisado en Goldsmith y Dhanasekaran, 2007) y dado que la mayoría de estos estudios están realizados en condiciones experimentales diferentes, actualmente es complicado establecer un modelo único de transmisión de la señal.

En base a los resultados mostrados en este capítulo podemos concluir que las rutas de AMPc/PKA y de las MAPks están implicadas de forma diferente en el control de la esteroidogénesis mediada por Fsh en las gónadas de peces, encontrando tanto mecanismos comunes como diferentes entre distintas especies y distinto sexo. En este capítulo mostramos un nuevo enfoque sobre cómo la Fsh controla la síntesis de esteroides, al estudiar el efecto de esta hormona en las rutas que regulan la expresión de distintos genes. Este trabajo refleja que la ruta de las MAPks juega un papel importante en la transmisión de la señal de la Fsh. Además, la ruta de las MAPks controla la expresión de genes esteroidogénicos de una manera más amplia que la ruta de la PKA y este control está conservado entre distintas especies de peces. Finalmente, el dialogo entre estas dos rutas de señalización merece una investigación más profunda que podría revelar rutas alternativas de señalización del AMPc.

Capítulo 7. DISCUSIÓN GENERAL

El éxito en la domesticación de una especie radica, entre otros aspectos, en el control de su reproducción. El conocimiento básico sobre el control endocrino de la espermatogénesis, y la ovogénesis, es fundamental para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas destinadas a solucionar los problemas de fertilidad asociados a los stocks de reproductores. Adicionalmente permitiría la generación de herramientas preventivas contra la maduración precoz que acontece en muchas especies cultivadas de forma intensiva, como es el caso de la lubina (Carrillo et al., 2009).

La presente Tesis Doctoral tenía como objetivo general profundizar en el conocimiento del papel de la Fsh durante el proceso de espermatogénesis en peces. Se ha usado como modelo la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) y se han realizado distintas aproximaciones experimentales para abordar dicho objetivo. Es por ello que la discusión general se desglosa en dos apartados relativos a (7.1) la optimización del método de transferencia génica somática para tratamientos hormonales sistémicos, (7.2) el estudio de la función de las GtHs de lubina: *in vivo* a largo plazo (7.2.1) e *in vitro* a corto plazo (7.2.2).

7.1. Transferencia génica somática en peces y su uso como terapia hormonal

Uno de los principales desafíos que tiene que afrontar la acuicultura es el bloqueo reproductivo que generan las condiciones de cautividad en el stock de reproductores. En muchas ocasiones, en las especies cultivadas, la maduración gonadal, ovulación o espermiación no ocurre de manera espontánea o sincrónica en cautividad (Zohar y Mylonas, 2001). Por ello, para inducir o sincronizar la reproducción artificialmente se han desarrollado diferentes procedimientos como la manipulación de los factores ambientales (fotoperiodo y temperatura del agua) o los tratamientos hormonales. Entre estos últimos los más utilizados tradicionalmente son la administración de extractos de pituitaria (Fontenele, 1955), de GnRH α , un agonista del GnRH (Revisado en Zohar y Mylonas, 2001) o de hCG (revisado en Mylonas et al., 2010). La posibilidad de usar hormonas homólogas siempre es más ventajosa que el uso de hormonas heterólogas, como la hCG, al emular más exactamente las funciones de la hormona nativa correspondiente. Gracias al rápido desarrollo en la tecnología de producción de proteínas recombinantes las hormonas propias de cada especie están, potencialmente están cada vez más disponibles (Levavi-Sivan et al., 2010). El uso de hormonas recombinantes también supone una gran ventaja frente al uso de hormonas nativas, cuya disponibilidad y pureza no siempre están aseguradas. Sin embargo, escalar la producción de las proteínas recombinantes para obtener grandes cantidades no siempre es

fácil, y en ocasiones estas producciones puede tener un precio elevado. Considerando este aspecto, las inyecciones con DNA plasmídico que contenga las secuencias codificantes de las GtHs, tal y como se presentan en esta Tesis, pueden ser una alternativa mucho más barata y fácil de obtener que el uso de hormonas recombinantes, ya que la construcción de los vectores plasmídicos es relativamente sencilla y su producción es fácil de escalar.

Las inyecciones con DNA plasmídico en tejido adulto, preferentemente en músculo, se enmarcan en la técnica conocida como transferencia génica somática. En peces, el uso de esta técnica se ha centrado fundamentalmente en su aplicación como medida profiláctica frente a diferentes enfermedades de origen vírico (Revisado en Kurath, 2008). En los trabajos referenciados los plásmidos inyectados contenían secuencias codificantes de proteínas de la cubierta de ciertos virus, las cuales actúan como antígenos para forzar el desarrollo de anticuerpos y lograr inmunidad frente al patógeno. En peces, solo existe un único trabajo publicado en el que tras la inyección con DNA plasmídico se hayan evaluado los niveles circulantes del producto codificado (Lorenzen et al., 2000). En este trabajo se inyectó intramuscularmente un plásmido que contenía la secuencia de un anticuerpo en forma de cadena única, y posteriormente se evaluaron los niveles sanguíneos del anticuerpo sintetizado por las células del músculo. Esta técnica se ha empleado extensivamente en mamíferos como terapia hormonal (Tripathy et al., 1996; Draghia-Akli et al., 2004), sin embargo, hasta la presente Tesis, nunca había sido ensayada en peces.

En trabajos anteriores desarrollados por el Grupo de Fisiología de la Reproducción de Peces del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS-CSIC), se puso a punto la técnica de transferencia génica en músculo de lubina (Muñoz et al., 2013), estableciendo que el éxito radica en la inyección de altas dosis de plásmido (75-100 µg), en el uso de un promotor adecuado en la construcción a inyectar y un estado metabólicamente activo del músculo, que se consigue manteniendo a los peces a una temperatura templada. Es por ello que en el diseño experimental de los tres trabajos *in vivo* aquí presentados, los animales inyectados con DNA plasmídico se mantuvieron a 17°C, asegurando así una buena incorporación del DNA a las células musculares. Esta temperatura no afectó a la capacidad de respuesta del proceso reproductivo, ya que en trabajos anteriores (Zanuy et al. 1987) se demostró que el rango óptimo de temperatura en lubina es de 9°-17° C. En la presente Tesis se perseguía optimizar la técnica de transferencia génica somática y confirmar su funcionalidad como terapia hormonal, comparando sus efectos con los obtenidos tras la inyección directa de GtHs recombinante. Estos resultados se presentan en el capítulo 3 de esta Tesis Doctoral, y

confirman la liberación al torrente sanguíneo de la scLh inyectada, como construcción de DNA, en músculo de lubina. Posteriormente se empleó la misma metodología, pero inyectando un plásmido codificante de la scFsh (Capítulo 4) o plásmidos codificantes de ambas hormonas, scFsh y scLh (Capítulo 5), demostrándose la utilidad de esta metodología para la investigación básica sobre la función fisiológica de estas hormonas, así como su potencial como terapia hormonal.

Para las construcciones de DNA empleadas para expresar la scLh y la scFsh se usó pcDNA3 (Invitrogen) como vector plasmídico que contiene el promotor de origen viral CMV para dirigir la expresión de los genes introducidos. El uso de vectores virales o plásmidos que incluyen promotores virales está muy extendido en trabajos de transferencia génica somática en mamíferos, ya que generan altos niveles de expresión de la secuencia codificante introducida (Ratanamart y Shaw, 2006). Sin embargo desde el punto de vista de la seguridad el uso de vectores/promotores de origen vírico es problemático debido, por ejemplo, al carácter inmunoestimulador intrínseco de estos vectores. En muchos trabajos realizados en mamíferos se han utilizado, con éxito, este tipo de construcciones como tratamiento contra diferentes enfermedades (Bettan et al., 2000; Fewell et al., 2001; Rizzuto et al., 2000; Fattori et al., 2005) y como terapia endocrina (Anwer et al., 1998; Abai et al., 1999) y no han provocado complicaciones. Sin embargo estos resultados deben tomarse con cautela, puesto que existe un caso documentado de complicación médica y muerte de un paciente tras la inyección de un vector recombinante de adenovirus (Raper et al., 2003). No obstante hay que destacar que en ese caso los problemas se debieron a la aplicación sistémica del vector viral, lo que derivó en una respuesta inflamatoria aguda. Este riesgo no existe cuando las inyecciones se realizan en el músculo, ya que la dispersión del DNA plasmídico inyectado a otros órganos es muy baja y de corta duración (Verri et al., 2003). En lubina se ha confirmado que el DNA plasmídico inyectado intramuscularmente permanece mayoritariamente en el área de aplicación, ya que no se ha encontrado expresión del DNA plasmídico foráneo en otros tejidos analizados (Muñoz et al., 2013). Por lo tanto, considerando que las inyecciones realizadas en esta Tesis se han localizado en el músculo, es bastante improbable que puedan suponer un riesgo para los animales tratados. No obstante se están buscando alternativas a los promotores virales como el uso de promotores específicos para el tejido en el que se va a realizar la inyección. Por ejemplo, para inyecciones en músculo se han probado en otras especies construcciones de DNA que contienen el promotor de beta-actina, creatinina o miosina (Ratanamart y Shaw, 2006), también se ha ensayado en peces el promotor de la beta-

actina de carpa (Anderson 1996, Liu 1990; Martínez-López et al., 2013). Sin embargo, cuando este promotor se probó en lubina (Muñoz et al., 2013) mostró una acción mucho más débil que la del promotor CMV. En este trabajo, la inyección intramuscular de las construcciones de DNA para la scLh y la scFsh, dio lugar a un aumento en los niveles plasmáticos de Lh o Fsh sin afectar a la supervivencia de los animales tratados. Por tanto podemos considerar que ésta es una metodología aplicable para inducir la maduración gonadal en stocks de reproductores. No obstante es importante seguir investigando en la mejora del diseño de los plásmidos, para que, evitando el uso de promotores virales, se consigan expresiones más altas, duraderas y seguras para su aplicación biotecnológica. Otro aspecto a mejorar en esta metodología es la administración de los plásmidos, para lo cual se han desarrollado múltiples métodos de transferencia, tanto físicos como químicos (revisado en Niidome y Huang, 2002; Schmidt-Wolf y Schmidt-Wolf, 2003), que persiguen aumentar la incorporación del plásmido en las células con el fin de conseguir una expresión mayor y más duradera de las secuencias inyectadas. En lubina (Muñoz et al., 2013) se han probado métodos químicos como la aplicación de bupivacaína (Ajiki et al., 2003), o el uso de polímeros para acomplejar el DNA (Mumper et al., 1998), sin lograr una mejora en la incorporación del DNA inyectado. En esta Tesis se ha probado un método de transferencia físico, como es la electroporación, y se ha evaluado su capacidad para incrementar la incorporación de plásmido en las células musculares, y por tanto la expresión del mismo. La electroporación (Neumann et al., 1982) hace que la membrana de las células sea más permeable a la penetración del DNA y se ha usado *in vivo* con éxito en diversas especies de mamíferos (Fewell et al., 2001; Lucas et al., 2001; Terada et al., 2001). En peces, la electroporación *in vivo* solo se ha utilizado en el pez cebra (Tawk et al., 2002; Rambabu et al., 2005; Lin et al., 2009). Diseñar un protocolo de electroporación *in vivo* del músculo de lubina, basado en los trabajos previos en pez cebra resulta imposible debido a la diferencia de tamaño entre estas dos especies, y sobre todo a la diferencia en el tipo de electrodo que se puede emplear. Previamente a los experimentos de esta Tesis Doctoral, y tras una revisión de protocolos de electroporación (Li et al., 2008), para lubina habíamos determinado previamente que la inyección en músculo de un plásmido que contenía el gen marcador de la luciferasa (pCMV-Luc), seguida de la electroporación *in vivo* (Muñoz et al., 2013) de músculo de lubina con un dispositivo de agujas y con pulsos cuadrados de 20 ms y 90 V/cm, eran suficientes para incrementar la expresión de un gen de luciferasa inyectado previamente, sin generar daño en los peces. Por ello en el primer experimento de inyección con pcDNA3-scLh se aplicaron 8 pulsos de 90 V/cm y 20 ms. A pesar de que no se observó daño tisular en

la zona de la descarga eléctrica, se consideró que ese protocolo podía ser excesivo para los animales de los experimentos descritos en el capítulo 4, debido a su menor tamaño, de manera que los pulsos aplicados se redujeron a 4, pero se mantuvieron las condiciones de duración y voltaje. La electroporación *in vivo* mejoró notablemente la eficiencia de la inyección con pcDNA3-scLh, ya que por un lado se logró que la respuesta en el grupo electroporado, medida ésta como incremento de Lh plasmática respecto al grupo control, fuera más homogénea que en el grupo sólo inyectado, y además se incrementó el porcentaje de animales que respondieron a la inyección con pcDNA3-scLh (Tabla 3.1, Capítulo 3). A partir del día 14 tras la primera inyección el 100% de los animales inyectados y electroporados mostraron un aumento de Lh en plasma, como respuesta positiva a la inyección, permaneciendo así hasta el día 34. Por el contrario, los animales que sólo se inyectaron presentaron porcentajes de respuesta inferiores y decrecientes a medida que el experimento avanzaba, y el día 34 solo un 8% de los animales seguía teniendo una respuesta positiva. Estos datos podrían indicar que la electroporación, además de homogenizar la respuesta y aumentar la incorporación del plásmido, podría aumentar el período de expresión del mismo, tal y como se ha sugerido en algunos trabajos (Vicat et al., 2000; Bettan et al., 2000). Se ha propuesto que los protocolos de electroporación que usan voltaje alto y corta duración (Vicat et al., 2000) generan una expresión más duradera del DNA plasmídico, lo que lleva a nuevas posibilidades de implementación de la metodología, siendo interesante investigar más en protocolos alternativos para electroporación en peces.

En los dos primeros experimentos de transferencia génica somática (Capítulos 3 y 4) se realizaron inyecciones con las hormonas recombinante, scLh o scFsh, en paralelo con la inyección de sus respectivos plásmidos de expresión, con el fin de comparar la funcionalidad biológica de estas hormonas sintetizadas *in vitro* con las sintetizadas por las células musculares que incorporaron los plásmidos pcDNA3-scLh o pcDNA3-scFsh. Estas GtHs recombinantes de cadena única muestran una actividad biológica idéntica a la hormona nativa, como previamente se ha demostrado en experimentos *in vitro* (Molés et al., 2011b), y son capaces de desencadenar la gametogénesis, como se discutirá en el siguiente apartado.

Comparando los perfiles hormonales de los grupos tratados con los plásmidos pcDNA3-scLh o pcDNA3-scFsh frente a los tratados con las hormonas scLh o scFsh, se observa claramente que las inyecciones plasmídicas generaron una mayor persistencia de la hormona en sangre (Capítulo 3, Fig. 3.2y Capítulo 4, Fig. 4.1), aproximadamente unos 20 días, lo cual supone una ventaja cuando se requiere un tratamiento hormonal de larga duración. Estos

experimentos, comparando el efecto de la inyección de GtHs recombinantes frente al efecto de los plásmidos codificantes de GtHs, sirvieron además para confirmar que la respuesta biológica generada en los grupos inyectados con las construcciones de DNA era similar a la de los animales inyectados con las hormonas recombinantes, demostrando que la hormona sintetizada a partir de las células musculares era capaz de llegar a las gónadas y ejercer su función biológica.

Una terapia hormonal óptima para inducir puestas es aquella que consigue su objetivo sin alterar la calidad de las mismas y que no implique tratamientos frecuentes, ya que la manipulación repetida de los reproductores provoca un nivel alto de estrés que puede bloquear la puesta o incluso causarles la muerte (Zohar y Mylonas, 2001). A este respecto, el desarrollo de análogos agonistas de GnRH, como el GnRHa, así como de sistemas de liberación sostenida, han supuesto una revolución en el tratamiento hormonal en peces encaminado al control de las puestas, puesto que prolongan el periodo de espermiación en los machos y las puestas múltiples en las hembras, manteniendo niveles elevados de GtHs en plasma (Zohar y Mylonas, 2001; Mylonas et al., 2010) sin manipulación excesiva de los animales. Las inyecciones de DNA codificante de GtHs también reúnen esas condiciones, ya que generan una liberación prolongada y sostenida de la hormona homóloga de la especie sin necesidad de administraciones repetidas. Se ha visto que los tratamientos con GnRH son eficaces cuando la maduración de las gónadas ya está iniciada, es decir que mejoran los procesos finales de la espermatogénesis y la espermiación en los machos y la maduración final y ovulación en las hembras, pero son incapaces de iniciar el desarrollo gonadal *de novo* o controlar las primeras etapas (Zohar y Mylonas, 2001). Una de las posibles explicaciones sería la falta de respuesta de la hipófisis a los estímulos con GnRH cuando el pez aun no ha iniciado la recrudescencia gonadal, siendo imposible entonces estimular la síntesis y/o liberación de las GtHs (Crim et al, 1983; Breton et al., 1998). Así pues, una de las mayores ventajas que plantea la metodología empleada en esta Tesis sobre los tratamientos con GnRH, es la posibilidad de inducir todo el desarrollo gonadal, ya que al trabajar a nivel de GtHs se puede promover gametogénesis de animales inmaduros, como se demuestra en los capítulos 4 y 5.

Los resultados aportados en los capítulos 3, 4 y 5 confirman que la transferencia génica somática es una herramienta poderosa para realizar estudios funcionales *in vivo*, y además de gran utilidad para su uso como terapia hormonal en peces. Estos experimentos demuestran que las células musculares de lubina son capaces de incorporar el DNA inyectado, y de

synthetizar y liberar al torrente sanguíneo una hormona recombinante funcional, apta para ejercer su acción en las gónadas.

7.2. Estudio de la función de las gonadotrofinas de lubina: estudios *in vivo* a largo plazo y estudios *in vitro* a corto plazo.

Con el fin de profundizar en la función específica que ejerce la hormona Fsh en el desarrollo gonadal, y más concretamente sobre la espermatogénesis de la lubina, los tratamientos con Fsh recombinante se organizaron a dos niveles; *in vivo* e *in vitro*. En los trabajos *in vivo* se ha evaluado el efecto a largo plazo de la administración de Fsh en su ámbito natural de acción, interaccionando con otros sistemas endocrinos/paracrinos que se activan durante la espermatogénesis. Los trabajos *in vivo* se complementaron con experimentos *in vitro* con explantes de gónada, en los que la acción aislada de la Fsh ha permitido perfilar de forma más pormenorizada su implicación en el proceso de esteroidogénesis, que acompaña y da soporte a la maduración gonadal.

La disponibilidad de herramientas para medir los niveles plasmáticos de GtHs en peces es limitada, lo que ha generado una falta de conocimiento del control endocrino de la reproducción en muchas especies. Los avances en este campo tradicionalmente han dependido del aislamiento y purificación de hormonas hipofisarias nativas (Levavi-Sivan et al., 2010), y al tratarse de un proceso costoso, en cuanto a tiempo y material, la información disponible se ha limitado a unas pocas especies (Zanuy et al., 2009). Actualmente se dispone de diversos sistemas de producción de proteínas recombinantes, tanto procariotas como eucariotas, que permiten obtener cantidades razonables de hormona con un coste muchísimo menor al que supone la purificación de las hormonas nativas. Además, estas hormonas recombinantes se pueden producir de forma continua, lo que las convierte en un elemento muy valioso para la investigación. Para el caso concreto de la lubina en el Grupo de Fisiología de la Reproducción de Peces del IATS-CSIC, donde se ha realizado la presente Tesis Doctoral, se han desarrollado dos sistemas de producción de GtHs recombinantes. Estos dos sistemas de expresión de GtHs recombinantes están basados en células de insecto (Sf9) y células de mamífero (CHO) (Molés et al., 2011b). Ambos sistemas proporcionan cantidades razonables de GtHs con altos niveles de bioactividad. Para el trabajo de esta Tesis se usaron las gonadotrofinas producidas en células CHO por presentar mayor estabilidad en sangre, posiblemente por la presencia del péptido carboxi-terminal (CTP) de la hCG o por su grado de glicosilación (Molés et al., 2011b).

7.2.1. Estudios *in vivo* a largo plazo

Las primeras inyecciones intramusculares realizadas con scFsh o con su plásmido codificante en juveniles macho de lubina mostraron el efecto proliferativo de esta hormona en el testículo de la lubina. El incremento en el porcentaje de células que incorporaron BrdU (cuantificado mediante detección inmunohistoquímica), así como la mayor presencia de células germinales propias de estados de gametogénesis más avanzados (StgB y espermatocitos) (Capítulo 4, Figura 4.4) observado en los grupos tratados con Fsh respecto a los controles, refuerzan el rol de esta hormona como señal iniciadora de la gametogénesis en machos de lubina. En el capítulo 5 de esta Tesis, en otro estudio *in vivo* a largo plazo, se procedió a inyectar de manera secuencial los plásmidos codificantes de la scFsh y la scLh, distanciados 15 días entre sí, para evaluar el efecto aislado o solapado de ambas gonadotrofinas sobre la espermatogénesis. En este segundo trabajo se evaluó el efecto proliferativo de la Fsh no tanto a nivel histológico como a nivel molecular, analizando los cambios en la expresión de genes marcadores de proliferación como *piwi* (Houwing et al., 2007; Cox et al., 2000) o *pcna* (Yazawa et al., 2000) y de meiosis como *scp3* (Iwai et al., 2006). Los análisis por qPCR de los niveles de mRNA de *piwi*, *pcna* y *scp3* confirmaron primero, que en lubina estos genes pueden emplearse como marcadores de proliferación y diferenciación de espermatogonias, al igual que se han venido usando en otras especies de peces (Chen et al., 2010; Yano et al., 2008; Iwai et al., 2006; Miura et al. 2002) y segundo, que la expresión de todos ellos aumenta tras el tratamiento con Fsh. Estos resultados concuerdan con las observaciones histológicas de las gónadas de estos mismos animales y demuestran que los grupos tratados con Fsh estaban en un estado de maduración gonadal más avanzado que los controles y los tratados con Lh (Capítulo 5, Figura 5.6), con presencia de espermatogonias B tardías y espermatocitos. Esta acción proliferativa de la Fsh sobre las espermatogonias observada en ambos experimentos también se ha descrito también en otras especies de vertebrados como el ratón (Allan et al., 2004; Singh et al., 1996, Abel et al., 2009) y el pollo (Méndez et al., 1998 y 2003). Por otra parte, en peces existe un único estudio *in vitro*, en anguila japonesa, donde se observa este mismo resultado (Kazeto et al., 2008). Esta escasez de información en peces se debe principalmente a la poca disponibilidad de GtHs homólogas para realizar estudios *in vivo* o *in vitro*, como se ha mencionado anteriormente. En la mayoría de los trabajos de estimulación gonadal con GtHs se han usado tratamientos con hCG como alternativa. Esta GtH humana, en peces tiene una acción análoga a la Lh, ya que comparten una estructura similar (Bousfield et al., 1994), aun así se ha observado que la hCG genera un efecto proliferativo sobre las células

germinales y somáticas en la anguila japonesa (Miura et al., 1991 a y b). Este efecto puede deberse a la promiscuidad del Fshr descrita en muchas especies de peces (Ko et al., 2007; Kumar et al., 2001; Kwok et al., 2005; Oba et al., 1999 a y b; Sambroni et al., 2007; Vischer et al., 2003) o a que la hCG provoque un incremento en los niveles de 11KT (García-López et al., 2010; Ohta y Tanaka, 1997), esteroide fundamental en la espermatogénesis (como se discutirá más adelante). En el caso de la anguila japonesa se ha descrito que la hCG no activa al Fshr (Kazeto et al., 2012), sin embargo sí que es capaz de promover la espermatogénesis (Miura et al., 1991a y 1991b), por tanto su efecto posiblemente está posiblemente mediado por esteroides. En lubina se estudiaron previamente las interacciones entre las GtHs y sus receptores, y se ha visto que tanto el Fshr como el Lhr son específicos para sus respectivos ligandos, no existiendo reacción cruzada (Molés et al., 2011b). Esto nos permite confirmar que en lubina la acción proliferativa de la Fsh se ejerce mediante la activación de su propio receptor, que al igual que en la mayoría de los vertebrados es esperable que se exprese en las células de Sertoli.

Contrariamente a lo que sucede en mamíferos, donde el FSHR se localiza en las células de Sertoli y el LHR en las células de Leydig, en algunas especies de peces se ha visto que el *fshr* también se expresa en las células de Leydig (Ohta et al., 2007; García-López et al., 2008; Chauvigné et al., 2012). Esta situación diferente a la de los mamíferos implica que en estos peces la Fsh puede actuar de manera directa sobre las células de Leydig, posiblemente estimulando su principal función, la síntesis de esteroides. La importancia e implicación de los andrógenos en general y de la 11KT en particular en la espermatogénesis se ha estudiado bastante en peces. Los trabajos realizados en anguila japonesa por el Dr. Takeshi Miura han aportado una información valiosa al mostrar que andrógenos como la 11KT son señales imprescindibles para iniciar la proliferación de las espermatogonias hacia la meiosis, e incluso se puede obtener la maduración total del testículo con el único estímulo de la 11KT (Miura et al., 1991 a y b, 1996). En lubina también se han realizado estudios que corroboran la implicación de los andrógenos en la maduración de las gónadas y el carácter esteroideogénico de la Fsh. Mediante el uso de implantes de T (Zanuy et al., 1999) u 11KT (Zanuy et al., comunicación personal) se ha obtenido la maduración testicular con la sola acción de los andrógenos. Por otro lado, se ha visto que la estimulación *in vitro* de explantes de testículo de lubina con Fsh nativa o recombinante (Molés et al., 2008 y 2011b) estimula la producción de 11KT o T. En esta Tesis se han confirmado esos resultados *in vivo*, observando que las inyecciones de Fsh generan un incremento en los niveles plasmáticos de 11KT

(Capítulo 4, Figura 4.2; Capítulo 5, Figura 5.1C). Es factible pensar que esta estimulación de la síntesis de esteroides sea debida a una acción directa sobre las células de Leydig, dado que esto es lo que sucede en otras especies de peces.

Considerando la implicación de los andrógenos en la recrudescencia gonadal, y teniendo en cuenta el incremento en los niveles de 11KT generados a partir de las inyecciones con Fsh, es posible concluir que en la lubina el inicio de la espermatogénesis es el resultado de una acción conjunta y coordinada de la Fsh y la 11KT. En el pez cebra (de Waal et al., 2009) el receptor de andrógenos se localiza en células de Sertoli que rodean espermatogonias indiferenciadas o tempranas. Esto indica que las células de Sertoli no son sólo diana de la Fsh sino también de la 11KT y esa doble estimulación es la que promovería su proliferación (Schulz et al., 2003) y la proliferación de las células germinales asociadas a ellas. En la trucha arcoíris el receptor de andrógenos también se ha localizado en células germinales, principalmente en espermatocitos y espermátidas y con menor intensidad en espermatogonias (Takeo y Yamashita, 2001), algo que también sucede en mamíferos (Vornberger et al., 1994; Kimura et al., 1993). A pesar de que en lubina no existen datos que corroboren la presencia o no de receptor de andrógenos en células germinales, existe la posibilidad de que la 11KT actúe directamente sobre las espermatogonias, promoviendo también su proliferación.

Los tratamientos con Lh de machos maduros (Capítulo 3) e inmaduros (Capítulo 5) de lubina con Lh y en combinación con Fsh en individuos inmaduros (Capítulo 5), han proporcionado información muy útil respecto al papel de estas GtHs durante las distintas etapas de la recrudescencia gonadal en lubina. Las inyecciones de animales inmaduros con Lh han demostrado que esta gonadotrofina, a diferencia de la Fsh, no es capaz por sí sola de iniciar el proceso de espermatogénesis, ya que la observación histológica de esos testículos, así como los niveles de expresión de *piwi*, *pcna* y *scp3* en el grupo tratado con Lh, muestran que no hay incremento en la proliferación y/o diferenciación de las espermatogonias. No obstante, es importante destacar que la expresión de estos tres genes, al final del periodo experimental en el Capítulo 5, es mayor en los animales co-inyectados con Fsh y Lh que en el grupo inyectado solo con Fsh, lo cual indica que aunque esta última no esté implicada directamente, su presencia también es importante para la proliferación y supervivencia de las espermatogonias (Allan et al., 2004). El único efecto a destacar en cuanto a cambios en expresión génica tras inyectar Lh, es el incremento en la expresión de genes codificantes de las enzimas esteroidogénicas *cyp17a1* y *cyp17a2*. Esta estimulación se ha descrito en otras especies de peces, como en el mero de pintas naranjas (*Epinephelus coioides*) (Cui et al., 2006), la

anguila japonesa (Kazeto et al., 2008) y el pez gato (Zmora et al., 2007). El tratamiento con Lh también provocó el aumento de los niveles plasmáticos de 11KT en la dorada japonesa (Kagawa et al., 1998), en salmón coho (Planas y Swanson, 1995) y en el pez cebra (García-López et al., 2010). Sin embargo, en este trabajo, la estimulación de la expresión de *cyp17a1* y *cyp17a2* no estuvo acompañada por un incremento en los niveles plasmáticos de 11-KT, contrariamente a lo descrito previamente por Molés y colaboradores (2011b) tras realizar cultivos *in vitro* de testículo. Es posible que el estado de maduración diferente de las gónadas condicionase esta respuesta, ya que en los trabajos *in vitro* anteriores se usaron animales adultos con testículos en espermatogénesis tardía, a diferencia de los animales pre-puberes de este trabajo *in vivo*. Además, en los tratamientos con Lh realizados en el Capítulo 3 con animales en espermiación, también se observó que el incremento de Lh plasmática no generaba un aumento de los niveles de 11KT, lo cual es concluyente sobre la falta de participación de la 11KT durante las etapas finales de maduración del espermatozoide y la espermiación (Mañanós et al., 2002; Borg, 1994). Todos estos resultados sugieren que la estimulación de la 11KT, por parte de la Lh, sucede en un momento puntual del proceso de recrudescencia gonadal, más concretamente durante la espermatogénesis tardía y no durante las etapas iniciales o finales de la espermatogénesis, lo cual coincide con el perfil de 11KT en sangre observado previamente en lubina por Rocha y colaboradores, (2009). Todos estos esteroides sexuales son el resultado final de la conversión de moléculas de colesterol por la acción de enzimas esteroidogénicas, proceso que tiene lugar en las células de Leydig. La regulación y activación de estas enzimas esteroidogénicas está bajo el control de las dos GtHs y existen datos en diversas especies que demuestran que tanto la Fsh como la Lh estimulan la expresión de sus transcritos (Sambroni et al., 2013; Luckenbach et al., 2011; Zmora et al., 2007). La elevación de los niveles plasmáticos de 11KT, tras el incremento de Fsh, podría implicar como intermediario un incremento en la expresión de los genes de las enzimas esteroidogénicas. Hemos detectado, mediante RT-qPCR, que los animales tratados con Fsh presentaban un incremento en la expresión de *cyp17a2* 36 días después de la primera inyección. Por otra parte, la acción de la Lh afectaba más a la expresión de *cyp17a1*, si bien para ambos genes la máxima expresión se alcanzó en el grupo que recibió la inyección secuencial, primero con Fsh y luego con Lh. En base a lo descrito en el pez cebra (García-López et al., 2010), la anguila japonesa (Zmora et al., 2007) y el ratón (Abel et al., 2009), la regulación de *cyp17a1* estaría bajo el control de la Fsh, mientras que en la lubina, en base a los niveles de expresión medidos en los experimentos del capítulo 5, la Lh también ejercería una función reguladora de esta enzima. Recientemente se ha descrito que existen dos

isoenzimas de la P450CYP17A (Zhou et al., 2007a), pero existe poca información en otras especies de peces respecto a su regulación y expresión durante la espermatogénesis. Los resultados obtenidos en esta Tesis muestran el primer perfil de expresión de *cyp17a2* durante la recrudescencia gonadal inducida, y por primera vez, también aportan información sobre la regulación de la transcripción de este gen por las GtHs. Considerando la falta de información al respecto, la regulación diferencial obtenida para los transcritos de estas enzimas esteroideogénicas puede deberse a variaciones específicas propias de cada especie.

Como ya se ha descrito en la introducción, la organización del testículo de la lubina consiste en agrupaciones de espermatogonias rodeadas por células de Sertoli, cuya población determinará el número de células germinales, al proporcionar los factores de crecimiento y supervivencia que necesitan estas células (Schulz et al., 2005; Griswold, 1998). También se ha descrito que las células de Sertoli median en la acción de la 11KT sobre las células germinales mediante la actuación de ciertos factores paracrinós producidos por ellas, y que son esenciales para el proceso de espermatogénesis. Entre estos destacan el Igf1 y el Igf2. Estos factores y su relevancia en la reproducción se ha estudiado ampliamente en mamíferos (Lin et al. 1986; Söder et al. 1992; Baker et al. 1996; Wang et al. 2003; Froment et al., 2007), y en menor medida en peces (Loir y Le Gac, 1994; Loir, 1994; Nader et al., 1999). Recientemente se ha descrito la existencia de un tercer componente de la familia de los Igf, el Igf3/Igf1b, que es específico de los peces y cuya expresión se localiza exclusivamente en las gónadas (Wang et al., 2008). En el pez cebra se ha demostrado que el Igf3 está implicado en el proceso de maduración de los oocitos (Li et al., 2011) y que su expresión está regulada por la Fsh (de Waal, 2009), pero no se han detectando cambios en su expresión tras la acción de la Lh. En lubina, la inyección con pcDNA3-scFsh generó un incremento significativo de la expresión de *igf3*, lo cual confirma que en esta especie la regulación de este factor también viene marcada por la acción de las GtHs, más concretamente de la Fsh, pero no de la Lh, ya que no se detectaron cambios en los grupos tratados con Lh.

Los péptidos que constituyen la familia del EGF, así como su receptor EGFR, están muy implicados en la regulación de diferentes procesos fisiológicos esenciales para la maduración gonadal debido a su función mitogénica y su implicación en la diferenciación celular (Caussanel et al., 1996). A diferencia de lo que sucede en otros vertebrados, en peces, la implicación de estos factores de crecimiento en el proceso de recrudescencia gonadal no se ha estudiado a fondo, por eso, uno de los objetivos de esta Tesis fue describir el patrón de expresión de ambos receptores así como de alguno de sus múltiples ligandos, para poder

inferir su posible papel durante este proceso. Se han descrito multitud de péptidos de la familia del EGF, y muchos de ellos están implicados en los procesos de ovulación y maduración de los oocitos (Shimada et al., 2006; Ashkenazi et al., 2005; Park et al., 2004), de proliferación de las espermatogonias (Abe et al., 2008), de esteroidogénesis durante la espermatogénesis (Verhoeven y Cailleau, 1986) y de capacitación del espermatozoide (Luna et al., 2012). En peces teleósteos, debido a la tercera ronda de duplicación del genoma que experimentaron respecto a otros vertebrados (Taylor et al., 2003), se han clonado y caracterizado dos *egfr* distintos (*egfra* y *egfrb*) en *Xiphophorus* (Gómez et al., 2004), medaka (Laisney et al., 2010) y lubina (esta Tesis). Hasta el momento hay muy poca información sobre estos dos receptores y no se conoce su localización específica a nivel testicular. En humanos el EGFR se ha localizado en las células de Leydig (Nakazumi et al., 1996), en ovejas en las células germinales (Kassab et al., 2007) y en jabalí (Wahab-Wahlgren et al., 2003) y en ratas (Caussanel et al., 1996) en ambas. Los niveles de expresión de *egfra* y *egfrb* en testículos de lubina durante la espermatogénesis inducida por GtHs (Capítulo 5, Figuras 5.4A y 5.4B,) presentaron una dinámica diferente, sin embargo en todos los grupos los niveles alcanzados al final del experimento fueron similares lo cual sugiere que la expresión de estos receptores ocurre durante todo el proceso de espermatogénesis. No obstante, de los resultados obtenidos aquí es difícil deducir si la expresión de estos receptores está bajo el control de las GtHs.

En los estudios funcionales de *egfra* y *egfrb* realizados en *Xiphophorus* (Gómez et al., 2004) se observa que los patrones de expresión de ambos genes se solapan y que la transducción de la señal de los receptores es similar, lo cual permite teorizar que, a pesar de las diferencias en cuanto a sus preferencias de unión de ligandos, ambos receptores tienen redundancia en su función. De los siete ligandos existentes para ambos receptores (Egf, Tgfa, Areg, Ereg, Hbegf, Btc y Epgn), en el Capítulo 5 se optó por evaluar los cambios de expresión del gen *btc*. Esta elección se basó en el patrón de expresión encontrado para cada uno de estos ligandos en medaka (Laisney et al., 2010). De todos ellos el gen *btc* se expresa predominantemente en testículo respecto a otros tejidos analizados, por lo cual se le podría atribuir una función especializada en éste órgano. La información relativa a este factor es escasa incluso en mamíferos, se sabe que la BTC tiene una actividad principalmente mitogénica (Dunbar y Goddard, 2000), promoviendo la proliferación y diferenciación celular (Caussanel et al., 1996). Dentro del marco reproductivo, en hembras, su papel sería el de mediar la acción de la hCG/LH durante la ovulación (Park et al., 2004; Ashkenazi et al.,

2005) y en machos se ha detectado que su estimulación promueve la proliferación de las espermatogonias (Wahab-Wahlgren et al., 2003). Los resultados obtenidos en esta Tesis constituyen el primer perfil de expresión de este factor durante la espermatogénesis en peces, pero se desconoce la función específica que desempeña la *Btc* en este proceso. En cultivos *in vitro* en rata (Park et al., 2004) y en ratón (Ashkenazi et al., 2005) se ha demostrado que en presencia de LH incrementan los niveles de expresión de *Btc*. En esta Tesis se detecta que el *btc* incrementa su expresión tras el tratamiento con scFsh (Capítulo 5, Figura 5.4C) lo cual coincide con lo descrito por Shimada y colaboradores (2006) en hembras de ratón tras la estimulación de ovarios *in vitro* con Fsh.

7.2.2. Estudios *in vitro* a corto plazo

La acción de las GtHs se realiza mediante la activación de sus receptores homólogos, y en el caso de la lubina se ha confirmado que esta activación es específica y no existe reacción cruzada del receptor de Fsh con la Lh (Molés et al., 2011b).

Una de las piezas claves para conocer la función fisiológica que ejerce la Fsh durante la espermatogénesis en lubina es caracterizar las rutas intracelulares que activa esta hormona. Se ha confirmado en varias especies de peces (García-López et al., 2008; Kazeto et al., 2008; Molés et al., 2008; Molés et al., 2011b; Ohta et al., 2007; Planas et al., 1997) que una de las funciones principales de la Fsh es promover la esteroidogénesis. Sin embargo, existen pocos estudios centrados en describir cómo se transduce la acción de esta hormona a nivel celular. Tradicionalmente la ruta más estudiada, y también la más utilizada por la Fsh para regular la síntesis de esteroides es la AMPc/PKA (Hunzicker-Dunn y Mauzels, 2006), pero hay evidencias tanto en peces (Benninghoff y Thomas, 2006; Paul et al., 2010) como en mamíferos (Gyles et al., 2001; Otis y Gallo-Payet, 2007) que esta regulación no está controlada exclusivamente por la PKA, ya que en estos trabajos también se ha descrito la importancia de las MAPks.

Mediante experimentos con explantes gonadales cultivados *in vitro*, puestos previamente a punto para lubina (Molés et al., 2008), se ha podido estudiar la acción de la Fsh de una forma más aislada y directa que en los estudios *in vivo* descritos en los Capítulos 4 y 5. Los resultados presentados en el Capítulo 6 corroboran los resultados obtenidos *in vivo*, y descritos en los Capítulos 4 y 5, sobre la capacidad de la Fsh para estimular la síntesis de esteroides en etapas tempranas de maduración, no solo en machos sino también en hembras. Los tratamientos *in vitro* con Fsh de testículos y ovarios inmaduros de lubina generaron un

incremento en la producción de 11KT y de T y E2, respectivamente, lo cual coincide con lo obtenido previamente por Molés y colaboradores (2008). Estos experimentos *in vitro* tenían como objetivo principal encontrar puntos clave de control de la esteroidogénesis regulados por la Fsh, y conservados entre especies y sexo, para definir así un mecanismo de acción general de la Fsh sobre este proceso. Por ello en el Capítulo 6 se ha comparado el efecto *in vitro* de la Fsh sobre la síntesis de esteroides en machos y hembras de dos especies de teleósteos, lubina y pez cebra.

Los tratamientos con Fsh y los análogos del AMPc 8Br-cAMP (activador) y Rp-cAMPs (inhibidor) generaron cambios en los niveles de esteroides tanto en ovarios como en testículos de lubina, demostrando que la estimulación de la esteroidogénesis por parte de la Fsh es consecuencia directa de la activación de la ruta AMPc/PKA (Figura 7.1), al igual que sucede en trucha arcoíris (Planas et al., 1997), corvina (Benninghoff y Thomas, 2006) y carpa común (Paul et al., 2010). Sin embargo, como ya se ha mencionado más arriba, ésta no es la única ruta usada por la Fsh, ya que la inhibición de la ruta MEK1/2, tras el tratamiento con PD98059, provocó una reducción de los niveles de esteroides, en línea con lo observado en corvina (Benninghoff y Thomas, 2006) y en carpa (Paul et al., 2010), confirmando así la implicación de la ruta de las MAPks en la regulación de la esteroidogénesis en lubina.

Para comprender cómo regula la Fsh la síntesis de esteroides se evaluaron mediante RT-qPCR los niveles de expresión de distintos genes que codifican enzimas esteroidogénicas. Se comprobó que la mayoría de los genes analizados están fuertemente regulados por la acción de esta GtH y que la respuesta en algunos casos está conservada entre sexos y especies.

Como ejemplo relevante está la proteína Star. Los análisis de expresión génica de *star* revelaron que la activación o inhibición de la ruta del AMPc/PKA condiciona los niveles de mRNA de este gen. A pesar de que el promotor de *Star* carece de sitios CRE, en aquellas especies en las que se ha estudiado, la vinculación entre la ruta del AMPc/PKA y la StAR es incuestionable incluso en mamíferos (Stocco, 2000). La acción de la StAR es esencial en el proceso de esteroidogénesis (Ariyoshi et al., 1998; Manna et al., 2003a; Stocco, 2000), ya que se encarga del transporte de colesterol a la membrana interna de la mitocondria de las células esteroidogénicas (Martinelle et al., 2004), para el posterior procesado y transformación de este precursor en esteroides. Dada la importancia de esta proteína en la síntesis de esteroides se entiende que su regulación debe ser universal y conservada, lo que explica que testículos y ovarios de lubina y pez cebra muestren resultados similares en la expresión de *star* tras la

estimulación con Fsh. Según se ha comprobado en mamíferos la regulación de *Star* no es una tarea exclusiva de la ruta del AMPc/PKA, ya que las MAPks también son capaces de controlar su expresión y por tanto la síntesis de esteroides (Gyles et al., 2001; Martinelle et al., 2004; Poderoso et al., 2008). En estos trabajos se describe esta regulación como el resultado de la comunicación entre las rutas del AMPc/PKA y ERK1/2 (Gyles et al., 2001), siendo el AMPc el activador de la cascada ERK (Figura 7.2). En esta Tesis se ha investigado la comunicación entre ambas rutas y su posible interconexión para controlar el proceso de esteroidogénesis en lubina. La activación de las MAPks tras la estimulación con Fsh no se disminuyó tras bloquear la ruta del AMPc/PKA con Rp-cAMPs, lo cual sugiere que en este contexto, la regulación de estas quinasas podría ser independiente del AMPc/PKA. Estos resultados también apuntan a que la Fsh podría regular la expresión de *star* empleando la ruta de las MAPks sin mediación del AMPc/PKA.

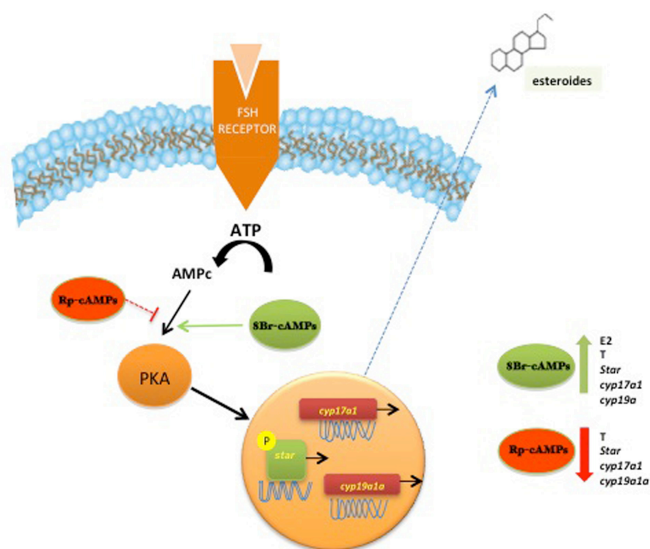


Figura 7.1. Modelo de regulación de la esteroidogénesis en lubina y pez cebra. La gonadotropina Fsh activa su receptor específico, Fshr, generando un incremento en los niveles de AMPc y la subsiguiente activación de la PKA. Este segundo mensajero activará la transcripción de genes codificantes de enzimas esteroidogénicas como *star*, *cyp19a1a* o *cyp17a1*, las cuales participarán en la transformación de las moléculas de colesterol en andrógenos y/o estrógenos. El análogo 8Br-cAMPs es capaz de simular el efecto de la Fsh sobre la expresión de enzimas esteroidogénicas y niveles de esteroides al activar la PKA. El análogo del AMPc Rp-cAMPs inhibe la actividad de la PKA bloqueando la transcripción de *star* y *cyp17a1*, y generando cambios en la producción de testosterona pero no de estradiol en ovarios

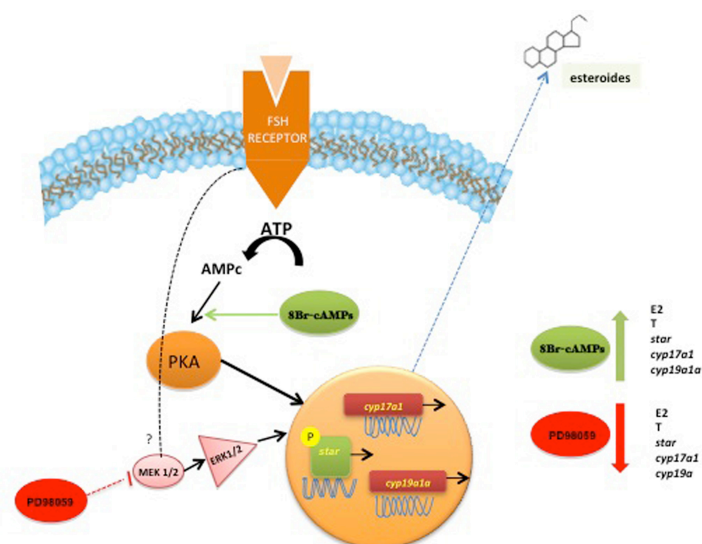


Figura 7.2. Modelo de regulación de la esteroidogénesis en lubina y pez cebra. La estimulación con Fsh además de incrementar los niveles de AMPc y activar la PKA podría activar las MEK1/2 independientemente de PKA. La consecuente fosforilación y activación de las ERK1/2 estimula la transcripción de los genes codificantes de enzimas esteroidogénicas *star*, *cyp17a1* y *cyp19a1a*, y por lo tanto se produce un incremento en los niveles de E2 y T. En presencia del inhibidor de MEK1/2 PD9809 se bloquea la fosforilación de ERK1/2, reduciéndose así la expresión de estas enzimas esteroidogénicas y disminuyéndose la síntesis de esteroides.

La Cyp17a1 es otra de las enzimas que presenta una regulación bastante conservada entre sexos y especies. Esta enzima es necesaria para la síntesis de E2 y 11KT y tanto en ovarios de pez cebra como en testículos de lubina y pez cebra se observó que el incremento en su expresión, tras la acción de la Fsh, está mediado por la activación de la ruta del AMPc/PKA. Estos resultados coinciden con lo descrito por Zhang y Mellon (1996), que demostraron que la activación de la ruta del AMPc/PKA lleva a la fosforilación del factor de transcripción SF-1; quien una vez fosforilado se dirige al núcleo y se une al promotor de *Cyp17a1* para estimular su expresión. Además, en esta Tesis se ha descrito cómo la ruta de las MAPks es capaz de regular la expresión de este gen de manera muy general, pues lo hace en ambas especies y sexos. Esta vía alternativa de regulación del *Cyp17a1* también se ha descrito en células de la teca bovinas, como una ruta usada por la LH para estimular la síntesis de esteroides (Fukuda et al., 2009). Dada la escasez de trabajos sobre la regulación transcripcional de *cyp17a1*, sobre todo en peces, resulta difícil establecer la manera como ambas rutas activan la expresión de este gen, pero todo parece indicar que la Fsh podría emplear las rutas del AMPc/PKA o las MAPks para regular la expresión de *cyp17a1* de forma independiente.

En estos experimentos también se evaluaron los cambios de expresión de genes que codifican enzimas específicas para la síntesis de E2 o 11KT, como son *cyp19a1a* y *cyp11β*, y que por lo tanto son de gran importancia en hembras y machos, respectivamente. Los análisis de expresión de *cyp19a1a* en ovarios de lubina y pez cebra mostraron una regulación conservada, ya que en ambos casos los tratamientos con Fsh aumentaron la expresión de este gen (Capítulo 6, Figs.6.6, 6.8A y 6.9) que se muestra estrictamente controlada por la ruta de las MAPks, aunque en el ovario del pez cebra se ve una influencia importante de la vía AMPc/PKA. La caracterización del promotor de *cyp19a1a* en lubina (Galay-Burgos et al., 2006; Navarro-Martin et al., 2011) y en pez cebra (Kazeto et al., 2001; Tong and Chung, 2003) muestra la presencia de diferentes sitios de unión de factores de transcripción, tales como SF-1 y CREB, lo cual justificaría su regulación por parte de AMPc/PKA. Sin embargo en ovario de lubina, tras el bloqueo del AMPc, no se observan variaciones en la expresión de *cyp19a1a*, lo que hace pensar en el uso de vías alternativas como la de las MAPks. Respecto a las MAPks no se conoce como éstas regulan la expresión de esta enzima en ambas especies, y sería interesante poder describir los mecanismos empleados por la cascada de ERK1/2 en trabajos futuros.

Los niveles de expresión de *cyp11β* en los cultivos de testículo de lubina tras el tratamiento con Fsh muestran una situación opuesta a la de *cyp19a1a*, al no detectar una regulación directa sobre la expresión de este gen, ni siquiera en presencia de los inhibidores de AMPc/PKA y ERK1/2. La enzima Cyp11β es responsable de la síntesis de 11β-hidroxitestosterona, precursor de la 11KT, sin embargo, a pesar de que el tratamiento con Fsh generó un incremento en los niveles de 11KT, los niveles de expresión de *cyp11β* no variaron en presencia de esta GtH. Rocha y colaboradores (2009) habían descrito previamente en lubina una correlación entre los niveles de expresión de este gen y los de expresión del *fshr*, y se justificó que la expresión de *cyp11β* fuera el resultado de la activación del Fshr. La discrepancia encontrada entre estos resultados pone en evidencia la necesidad de profundizar en la regulación de esta enzima, ya que es pieza clave en la ruta de síntesis de la 11KT, andrógeno esencial para la proliferación de las espermatogonias y por lo tanto para la maduración de los testículos en peces (Schulz et al., 2010).

De los resultados obtenidos en los cultivos *in vitro* con Fsh se concluye que para transmitir su señal una vez activado el Fshr, esta hormona no emplea una única ruta intracelular. Esta GtH hace uso de la ruta tradicional del AMPc/PKA para regular la expresión de los genes de determinadas enzimas esteroideogénicas, pero no de manera exclusiva, ya que se demuestra

que la Fsh también emplea la ruta de las MAPks, teniendo ésta incluso un control más amplio sobre diferentes enzimas esteroidogénicas. En estos experimentos se describe cómo estas rutas ejercen una acción independiente al regular la expresión de determinadas enzimas, observando, al mismo tiempo, mecanismos de regulación conservados entre sexos y especies. En resumen, en este capítulo se proporcionan datos nuevos sobre cómo la Fsh regula el proceso de síntesis de esteroides.

Capítulo 8. CONCLUSIONES

Primera: En peces, la transferencia génica intramuscular de DNAs codificantes de gonadotrofinas se puede usar como terapia génica para resolver disfunciones reproductoras asociadas a niveles bajos de hormonas gonadotropas, como Fsh y Lh. Así pues, la administración de plásmidos codificantes de gonadotrofinas específicas se podría usar como tratamiento de liberación prolongada en peces que muestren niveles deficitarios de las mismas.

Segunda: El incremento de los niveles plasmáticos de Lh, tras la administración en machos adultos de lubina de una Lh recombinante de cadena única o su secuencia codificante, induce un aumento del volumen de esperma sin afectar a los niveles de 11KT en plasma. Estos resultados indican que la Lh, pero no la 11KT, juega un papel importante en el proceso de espermiación.

Tercera: La Fsh en forma de cadena única o su secuencia codificante, inyectadas intramuscularmente, son capaces de activar la esteroidogénesis *in vivo* en machos juveniles de lubina, al generar, ambos tratamientos, un incremento de los niveles plasmáticos de 11KT.

Cuarta: El tratamiento de machos juveniles de lubina con Fsh recombinante desencadena el inicio de la espermatogénesis. El incremento de los niveles plasmáticos de Fsh provoca un aumento en la proliferación de espermatogonias A, su diferenciación a espermatogonias B y su entrada en meiosis, generando la aparición de cistes de espermatocitos y espermátidas. Este inicio de la espermatogénesis, estimulado por Fsh, se acompaña por un incremento de la expresión de genes implicados en la proliferación y la diferenciación de espermatogonias, tales como *piwi*, *pcna* y *scp3*.

Quinta: El inicio del crecimiento gonadal, tras la estimulación con la Fsh, está asociado a una reducción de la expresión de *amh* y a un aumento de expresión de *lhr* en el testículo de machos inmaduros de lubina. Esto sugiere que la Fsh actúa sobre las células de Sertoli para bloquear la expresión de *amh*, y prepara el testículo para la acción de la Lh.

Sexta: El tratamiento de machos juveniles de lubina con Lh recombinante muestra que la acción aislada de esta hormona es incapaz de iniciar la espermatogénesis, pues no se observaron cambios en el estado de maduración gonadal y en la expresión de genes marcadores de proliferación celular.

Séptima: La Fsh, tras activar a su receptor, induce la esteroidogénesis transmitiendo su señal a través de las rutas del AMPc/PKA y las MAPks. Para estimular la expresión de genes implicados en la síntesis de esteroides la Fsh usa ambas rutas de manera diferencial. Además se

ha observando que la ruta de las MAPks posee un control más amplio que la del AMPc/PKA sobre diferentes genes de enzimas esteroidogénicas.

Octava: La regulación que ejerce la Fsh sobre el proceso de esteroidogénesis gonadal presenta puntos conservados entre machos y hembras de las dos especies estudiadas aquí, la lubina y el pez cebra. Ambas especies presentan un patrón similar de regulación de la expresión de los genes *cyp19a1a*, *cyp17a1* y *star*, bajo la acción de la Fsh.

Capítulo 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abai, A.M., Hobart, P.M., Barnhart, K.M. (1999). Insulin delivery with plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 10, 2637-2649.
- Abe, K., Eto, K., Abe, S. (2008). Epidermal growth factor mediates spermatogonial proliferation in newt testis. *Reprod Biol Endocrinol* 6, 7.
- Abel, M., Wootton, A., Wilkins, V., Huhtaniemi, I., Knight, P., Charlton, H. (2000). The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* 141, 1795-1803.
- Abel, M.H., Baban, D., Lee, S., Charlton, H.M., O'Shaughnessy, P.J. (2009). Effects of FSH on testicular mRNA transcript levels in the hypogonadal mouse. *J Mol Endocrinol* 42, 291-303.
- Adams, T., Boime, I. (2008). The expanding role of recombinant gonadotropins in assisted reproduction. *Reprod Dom Anim* 43, 186-192.
- Aizen, J., Kasuto, H., Levavi-Sivan, B. (2007). Development of specific enzyme-linked immunosorbent assay for determining LH and FSH levels in tilapia, using recombinant gonadotropins. *Gen Comp Endocrinol* 153, 323-332.
- Ajiki, T., Murakami, T., Kobayashi, Y., Hakamata, Y., Wang, J., Inoue, S., Ohtsuki, M., Nakagawa, H., Kariya, Y., Hoshino, Y., et al. (2003). Long-lasting gene expression by particle-mediated intramuscular transfection modified with bupivacaine: combinatorial gene therapy with IL-12 and IL-18 cDNA against rat sarcoma at a distant site. *Cancer Gene Ther* 10, 318-329.
- Al-Attar, L., Noël, K., Dutertre, M., Belville, C., Forest, M.G., Burgoyne, P.S., Josso, N., Rey, R. (1997). Hormonal and cellular regulation of sertoli cell Anti-Müllerian hormone production in the postnatal mouse. *J Clin Invest* 100, 1335-1343.
- Allan, M., Garcia, A., Spaliviero, J., Zhang, F.P., Jimenez, M., Huhtaniemi, I., Handelsman, D. (2004). Complete sertoli cell proliferation induced by follicle-stimulating hormone (FSH) independently of luteinizing hormone activity: evidence from genetic models of isolated FSH action. *Endocrinology* 145, 1587-1593.
- Almeida, F.F.L., Kristoffersen, C., Taranger, G.L., Shulz, R.W. (2008). Spermatogenesis in Atlantic Cod (*Gadus Morhua*): A novel Model of cystic germ cell development. *Biol Reprod* 78 27-34.
- Amer, M., Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K. (2001). Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biol Reprod* 65, 1057-1066.
- Rocha, A, Gomez, A, Galay-Burgos, M., Zanuy, S. Sweeney, G., Carrillo, M. (2007). Molecular characterization and seasonal changes in gonadal expression of a thyrotropin receptor in the European sea bass. *Gen Comp Endocrinol* 152, 89-101.
- Anand-Ivell, R.J.V., Relan, V., Balvers, M., Coiffec-Dorval, I., Fritsch, M., Bathgate, R.A.D., Ivell, R. (2006). Expression of the insulin-like peptide 3 (INSL3) hormone-receptor (LGR8) system in the testis. *Biol Reprod* 74, 945-953.
- Andersen, D., Krummen, L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol* 13, 117-123.

- Anderson, E.D., Mourich, D., Leong, J.A. (1996). Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. *Mol Mar Biol Biotech* 5, 105-113.
- Ando, N., Miura, T., Nader, M.R., Miura, C., Yamauchi, K. (2000). A method for estimating the number of mitotic divisions in fish testes. *Fisheries Sci* 66 299-303.
- Anwer, K., Shi, M., French, M.F., Muller, S.R., Chen, W., Liu, Q., Proctor, B.L., Wang, J., Mumper, R.J., Singhal, A., et al. (1998). Systemic effect of human growth hormone after intramuscular injection of a single dose of a muscle-specific gene medicine. *Hum Gene Ther* 9, 659-670.
- Ariyoshi, N., Kim, Y.-C., Artemenko, I., Bhattacharyya, K.K., Jefcoate, C.R. (1998). Characterization of the rat Star gene that encodes the predominant 3.5-Kilobase pair mRNA. *J Biol Chem* 273, 7610-7619.
- Ascoli, M., Fanelli, F., Segaloff, D.L. (2002). The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endoc Rev* 23, 141-174.
- Ashkenazi, H., Cao, X., Motola, S., Popliker, M., Conti, M., y Tsafirri, A. (2005). Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology* 146, 77-84.
- Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Ramos, J., Kime, D.E., Carrillo, M., y Zanuy, S. (2002). Group-synchronous ovarian development, ovulation and spermiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenesis. *Sci Mar* 66, 273-281.
- Baker, J., Hardy, M.P., Zhou, J., Bondy, C., Lupu, F., Bellve, A.R., Efstratiadis, A. (1996). Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 10, 903-918.
- Balasubramanian, K., LaVoie, H.A., Garmey, L., Stocco, D.M., Veldhuis, J.D. (2008). Regulation of porcine granulosa cell steroidogenic acute regulatory protein (StAR) by insulin-like growth factor I: synergism with follicle-stimulating hormone or protein kinase A agonist. *Endocrinology* 138, 433-439.
- Begtashi, I., Rodríguez, L., Moles, G., Zanuy, S., Carrillo, M. (2004). Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). I. Morphological aspects. *Aquaculture* 241, 539-559.
- Behringer, R., Finegold, M.J., Cate, R. (1994). Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell* 79, 415-425.
- Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W., McNeil, J.H. (1976). Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives, and simple stains. *Stain Technol* 51, 71-87.
- Benninghoff, A., Thomas, P. (2006). Gonadotropin regulation of testosterone production by primary cultured theca and granulosa cells of Atlantic croaker: II. Involvement of a mitogen-activated protein kinase pathway. *Gen Comp Endocrinol* 147, 288-293.

- Benton, L., Shan, L.X., Hardy, M.P. (1995). Differentiation of adult Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53, 61-68.
- Bettan, M., Emmauel, F., Darteil, R., Caillaud, J.M., Soubrier, F., Delaere, P., Branelec, D., Mahfoudi, A., Duverger, N., Scherman, D. (2000). High level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Mol Ther* 2 204-210.
- Billard, R. (1969). La spermatogénese de *Poecilia reticulata*. I-Estimation du nombre de generations goniales et rendement de la spermatogénese. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 9, 460-469.
- Billard, R., Fostier, A., Weil, C., Breton, B. (1982). Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can J Fish Aquat Sci* 39, 15.
- Billard, R., Richard, M., 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.
- Billard, R., Richard, M., Breton, B. (1977). Stimulation of gonadotropin secretion after castration in rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 33, 163-165.
- Billiau, A., Sefrioui, H., Overbergh, L., Rutgeerts, O., Goebels, J., Mathieu, C., Waer, M. (2001). Transforming growth factor-beta inhibits lymphokine activated killer cytotoxicity of bone marrow cells: implications for the graft-versus-leukemia effect in irradiation allogeneic bone marrow chimeras. *Transplantation* 71, 292-299.
- Blázquez, M., Alicia, G., María, P., Constantinos, M., Francesc, P. (2008). Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Com Endocrinol* 158, 95-101.
- Blázquez, M., Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F. (2001). Critical period of androgen-inducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass. *J Fish Biol* 58, 342-357.
- Blázquez, M., Navarro-Martín, L., Piferrer, F. (2009). Expression profiles of sex differentiation-related genes during ontogenesis in the European sea bass acclimated to two different temperatures. *J Exp Zool* 312, 686-733.
- Blázquez, M., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F. (1998). Structural and functional effects of early exposure to estradiol-17 β and 17 α -ethynylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost *Dicentrarchus labrax*. *Fish Physiol Biochem* 18, 37-46.
- Blázquez, M.E., Garcia, A., Maria, P., Mylonas, C. , Piferrer, F. (2008). Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Comp Endocrinol* 158, 95-101.
- Bobe, J., Nguyen, T., Jalaber, B. (2004). Targeted gene expression profiling in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary during maturational competence acquisition and oocyte maturation. *Biol Reprod* 71, 73-82.

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

Boime, I., Ben Menahem, D. (1999). Glycoprotein hormone structure-function and analog design. *Recent Prog Horm Res* 54, 271-288.

Bommelaer, M.C., Billard, R., Breton, B. (1981). Changes in plasma gonadotropin after ovariectomy and estradiol supplementation at different stages at the end of the reproductive cycle in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Repro Nutr Develop* 21, 989-997.

Borg, B. (1994). Androgens in teleost fishes. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol* 109, 219-245.

Boudinot, P., Blanco, M., de Kinkelin, P., and Benmansour, A. (1998). Combined DNA immunization with the glycoprotein gene of viral hemorrhagic septicemia virus and Infectious hematopoietic necrosis virus induces double-Specific protective immunity and nonspecific response in rainbow trout. *Virology* 249, 297-306.

Bousfield, G.R., Perry, W.M., Ward, D.N. (1994). Gonadotropins. Chemistry and biosynthesis. In *The Physiology of Reproduction*, R. E. Knobil y J.D. Neill, ed. (New York: Raven Press), pp. 1749–1792

Braun, T., Schofield, P.R., Sprengel, R. (1991). Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO J* 10, 1885-1990.

Breton, B., Govoroun, M., Mikolajczyk, T. (1998). GTH I and GTH II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary responsiveness to GnRH-a stimulation. *Gen Comp Endocrinol* 111, 13.

Breton, B., Sambroni, E. (1996). Steroid activation of the brain-pituitary complex gonadotropic function in the triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 10, 38-50.

Brock, C., Chaefer, M., Reusch, H.P., Czupalla, C., Michaelke, M., Spicher, K., Zchultz, G., Nürnberg, B. (2002). Roles of Gβγ in membrane recruitment and activation of p110γ/p110 phosphoinositide 3-kinase γ. *JCB* 160, 89-99.

Burzawa-Gerard, E. (1971). Purification d'une hormone gonadotrope hypophysaire de poisson téléostéen la carpe (*Cyprinus carpio* L.). *Biochimie* 53, 545-552.

Burzawa-Gerard, E. (1982). Chemical data on pituitary gonadotropins and their implication to evolution. *Can J Fish Aquat Sci* 39, 80-91.

Callard, G. (1996). Endocrinology of Leydig cells in nonmammalian vertebrates. In *The Leydig Cell*, A.H. Payne, Hardy, M.P., Russell, L.D., ed. (Vienna, IL, USA: Cache River Press), pp. 308-331.

Camp, T.A., Rahal, J.O., Mayo, K.E. (1991). Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol* 5, 34-44.

Campbell, B., Dickey, J., Beckman, B., Young, G., Pierce, A., Fukada, H., Swanson, P. (2006). Previtellogenic oocyte growth in salmon: relationships among body growth, plasma insulin-Like growth factor-1, estradiol-17 β , follicle-stimulating hormone and expression of ovarian genes for insulin-Like growth factors, steroidogenic-acute regulatory protein and receptors for gonadotropins, growth hormone, and somatolactin. *Biol Reprod* 75, 34-44.

Carrillo, M., Zanuy, S., Bayarri, P. (2009). El control ambiental de la reproducción de los peces con especial referencia al control del ciclo sexual, de la pubertad y de la precocidad. En: La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura (Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura), pp. 175-336.

Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Cerdá, J., Mañanós, E., Bromage, N. (1995). Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In Broodstock management and egg and larval quality, N. Bromage, and R. Roberts, eds. (London: Blackwell Science), pp. 138-168.

Castillo, J., Castellana, B., Acerete, L., Planas, J.V., Goetz, F.W., Mackenzie, S., Tort, L. (2008). Stress-induced regulation of steroidogenic acute regulatory protein expression in head kidney of Gilthead seabream (*Sparus aurata*). *J Endocrinol* 196, 313-322.

Cate, R.L., Mattaliano, R.J., Hession, C., Tizard, R., Farber, N.M., Cheung, A., Ninfa, E.G., Frey, A.Z., Gash, D.J., Chow, E.P., et al. (1986). Isolation of the bovine and human genes for müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 45, 685-698.

Caussanel, V., Taboneb, E., Mauduit, C., Dacheux, F., Benahmed, M. (1996). Cellular distribution of EGF, TGF α and their receptor during postnatal development and spermatogenesis of the boar testis. *Mol Cell Endocrinol* 123, 61-68.

Cerdá, J. (2009). Mecanismos moleculares durante la maduración y ovulación del oocito de teleósteos: Avances recientes y su aplicación en Acuicultura. In La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura (Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura), pp. 401-456.

Chaudhary, L.R., Stocco, D.M. (1988). Stimulation of progesterone production by phorbol-12-myristate-13-acetate in MA-10 Leydig tumor cells. *Biochimie* 70, 1353-1360.

Chauvigné, F., Verdura, S., Mazón, M., Duncan, N., Zanuy, S., Gómez, A., Cerdá, J. (2012). FSH and LH mediate the androgenic pathway in leydig cells of an evolutionary advanced teleost. *Biol Reprod* 87, 12.

Chaves-Pozo, E., Liarte, S., Vargas-Chacoff, L., Garcia-Lopez, A., Mulero, V., Meseguer, J., Mancera, M., Garcia-Ayala, A. (2007). 17 β -Estradiol triggers postspawning in spermatogenically active gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) males. *Biol Reprod* 76, 142-148.

Chen, C., Wen, H., Wang, Z., He, F., Zhang, J., Chen, X., Jin, G., Shi, B., Shi, D., Yang, Y., et al. (2010a). Cloning and expression of P450c17-1 (17 α -hydroxylase/17,20-lyase) in brain and ovary during gonad development in *Cynoglossus semilaevis*. *Fish Physiol Biochem* 36, 1001-1012.

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

- Chen, Z.Y., Yant, S.R., He, C.Y., Meuse, L., Shen, S., Kay, M.A. (2001). Linear DNAs concatemerize *in vivo* and result in sustained transgene expression in mouse liver. *Mol Ther* 3, 403-410.
- Choi, J.H., Choi, K.C., Auersperg, N., Leung, P.C.K. (2005). Gonadotropins upregulate the epidermal growth factor receptor through activation of mitogen-activated protein kinases and phosphatidyl-inositol-3-kinase in human ovarian surface epithelial cells. *Endocr Relat Cancer* 12, 407-421.
- Clark BJ, DM, S. (1996). StAR-A tissue specific acute mediator of steroidogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 7, 227-233.
- Cobb, J., Handel, M.A. (1998). Dynamics of meiotic prophase I during spermatogenesis: from pairing to division. *Semin Cell Dev Biol* 9, 445-450.
- Conti, M., Hsieh, M., Park, J.Y., Su, Y.Q. (2006). Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Mol Endocrinol* 20, 715-723.
- Corbeil, S., Kurath, G., Lapatra, S.E. (2000). Fish DNA vaccine against infectious hematopoietic necrosis virus: efficacy of various routes of immunisation. *Fish Shellfish Immunol* 10, 711-723.
- Cottom, J., Salvador, L.M., Maizels, E.T., Reierstad, S., Park, Y., Carr, D.W., Davare, M.A., Hell, J.W., Palmer, S.S., Dent, P., et al. (2003). Follicle-stimulating hormone activates extracellular signal-regulated kinase but not extracellular signal-regulated kinase kinase through a 100-kDa phosphotyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 278, 7167-7179.
- Cox, D.N., Chao, A., Lin, H. (2000). *piwi* encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germ- line stem cells. *Development* 127, 503-514.
- Crespo, B., Gomez, A., Mazon, M.J., Carrillo, M., Zanuy, S. (2013). Isolation and characterization of Ff1 and Gsdf family genes in European sea bass and identification of early gonadal markers of precocious puberty in males. *Gen Comp Endocrinol* 191, 155-167.
- Crim, L.W., Evans, D.M. (1983). Influence of testosterone and/or luteinizing hormone releasing hormone analogue on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout. *Biol Reprod* 29, 137-142.
- Cui, M., Li, W., Liu, W., Yang, K., Lin, H. (2006). Production of recombinant orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) luteinizing hormone in insect cells by the baculovirus expression system and Its biological effect. *Biol Reprod* 76, 74-84
- Dai, C., Yang, J., and Liu, Y. (2002). Single injection of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor prevents cell death and ameliorates acute renal failure in mice. *J Am So Nephrol* 13, 411-422.
- Dan, Q., Anne-Marie, Z., Wei, D., Leendert, H.J.L., Haifan, L. (2002). Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene* 21, 3988-3999.
- Das, S., Maizels, E.T., DeManno, D., St.Clair, E., Adam, S.A., Hunzicker-Dunn, M. (1996). A stimulatory role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in follicle-stimulating hormone-activated

mitogen-activated protein kinase signaling pathway in rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 137, 967-974.

De Leew, R., Wurth, Y.A., Zandbergen, M.A., Peute, J., Goos, H.J. (1986). The effects of aromatizable androgens, non aromatizable androgens and estrogens on gonadotropin release in castrated African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Cell Tissue Res* 243, 87-94.

de Rooij, D.G., Grootegoed, J.A. (1998). Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 10, 694-701.

de Rooij, D.G., Russell, L.D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 21, 776-798.

de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A., Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474-477.

de Waal PP, Leal MC, Garcia-Lopez A, Liarte S, de Jonge H, Hinfray N, Brion F, Schulz RW, J., B. (2009). Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in the zebrafish testis. *J Endocrinol* 202, 287-297.

DeManno, D.A., Cottom, J.E., Kline, M.P., Peters, C.A., Maizels, E.T., Hunzicker-Dunn, M. (1999). Follicle-stimulating hormone promotes histone H3 phosphorylation on serine-10. *Mol Endocrinol* 13, 91-105.

Devlin, R., Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208, 191-364.

di Clemente, N., Wilson, C., Faure, E., Boussin, L., Carmillo, P., Tizard, R., Picard, J.Y., Vigier, B., Josso, N., Cate, R. (1994). Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. *Mol Endocrinol* 8, 1006-1020.

Dijkstra, J., Okamoto, H., Ototake, M., Nakanishi, T. (2001). Luciferase expression 2 years after DNA injection in glass catfish (*Kryptopterus bicirrhus*). *Fish Shellfish Immun* 11, 199-202.

Donaldson, E.M., Yamazaki, F., Dye, H.M., Philleo, W.W. (1972). Preparation of gonadotropin from salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) pituitary glands. *Gen Comp Endocrinol* 18, 469-480.

Drabick, J.J., Glasspool-Malone, J., Somiari, S., King, A., Malone, R.W. (2001). Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by *in vivo* electroporation. *Mol Ther* 3, 249-255.

Draghia-Akli, R., Fiorotto, M.L. (2004). A new plasmid-mediated approach to supplement somatotropin production in pigs. *J Animal Sci* 82, E264-E269.

Dunbar, A.J., Goddard, C. (2000). Structure-function and biological role of betacellulin. *Intel J Biochem Cell B* 32, 805-815.

Durlinger, A.L.L., Gruijters, M.J.G., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T.R., Matzuk, M.M., Rose, U.M., de Jong, F.H., Uilenbroek, J.T.J., Grootegoed, J.A., et al. (2001). Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 142, 4891-4899.

Dyson, M.T., Kowalewski, M.P., Manna, P.R., and Stocco, D.M. (2009). The differential regulation of steroidogenic acute regulatory protein-mediated steroidogenesis by type I and type II PKA in MA-10 cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 300, 94-103.

Eddy, E.M. (1998). Regulation of gene expression during spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 9, 451-457.

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

Escoffre, J., Teissié, J., Rols, M. (2010). Gene transfer: How can the biological barriers be overcome? *J Membrane Biol* 236, 61-74.

Essex-Fraser, P.A., Steele, S.L., Bernier, N.J., Murray, B.W., Stevens, E.D., Wright, P.A. (2005). Expression of four glutamine synthetase genes in the early stages of development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relationship to nitrogen excretion. *J Biol Chem* 280, 20268-20273.

Evaul, K., Hammes, S. (2008). Cross-talk between G protein-coupled and epidermal growth factor receptors regulates gonadotropin-mediated steroidogenesis in leydig cells. *J Biol Chem* 283, 27525-27533.

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

Fattori, E., Cappelletti, M., Zampaglione, I., Mennuni, C., Calvaruso, F., Arcuri, M., Rizzuto, G., Costa, P., Perretta, G., Ciliberto, G., et al. (2005). Gene electro-transfer of an improved erythropoietin plasmid in mice and non-human primates. *J Gene Med* 7, 228-236.

Faurez, F., Dory, D., Le Moigne, V., Gravier, R., Jestin, A. (2010). Biosafety of DNA vaccines: new generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmid after injection. *Vaccine* 28, 3888-3895.

Fauvel, C., Savoye, O., Dreanno, C., Cosson, J., Suquet, M. (1999). Characteristics of sperm of captive seabass in relation to its fertilization potential. *J Fish Biol* 54, 356-369.

Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Kimura, H., Strüssmann, C.A., Somoza, G.M. (2008). Expression profile and estrogenic regulation of anti-Müllerian hormone during gonadal development in pejerrey *Odontesthes bonariensis*, a teleost fish with strong temperature-dependent sex determination. *Dev Dynam* 237, 3192-3199.

Fewell, J.G., MacLaughlin, F., Mehta, V., Gondo, M., Nicol, F., Wilson, E., Smith, L.C. (2001). Gene therapy for the treatment of hemophilia B using PINC-formulated plasmid delivered to muscle with electroporation. *Mol Ther* 3, 574-583.

Filippa, N., Sable, C., Filloux, C., Hemmings, B., Van Obberghen, E. (1999). Mechanism of protein kinase B activation by cAMP dependent protein kinase. *Mol Cel Biol* 19, 4989-5001.

Fishelson, L. (2003). Comparison of testes structure, spermatogenesis, and spermatocytogenesis in young, aging, and hybrid cichlid fish (Cichlidae, Teleostei). *J Morphol* 256, 285-300.

Fishelson, L., Delarea, Y., Gon, O. (2006). Testis structure, spermatogenesis, spermatocytogenesis, and sperm structure in cardinal fish (Apogonidae, Perciformes). *Anat Embryol* 211, 31-46.

Fontenele, O. (1955). Injecting pituitary (Hypophyseal) hormones into fish to induce spawning. *Prog Fish Cult* 17, 71-75.

Friedenreich, H., Scharl, M. (1990). Transient expression directed by homologous and heterologous promoter and enhancer sequences in fish cells. *Nucleic Acids Res* 18, 3299-3305.

Frisen, L. (1967). Rapid transmandibular hypophysectomy of small fish. *Experientia* 23, 1079-1081.

Froment, P., Vigier, M., Negre, D., Fontaine, I., Beghelli, J., Cosset, F.L., Holzenberger, M., Durand, P. (2007). Inactivation of the IGF-I receptor gene in primary Sertoli cells highlights the autocrine effects of IGF-I. *J Endocrinol* 194, 557-568.

Fukuda, S., Orisaka, M., Tajima, K., Hattori, K., Kotsuji, F. (2009). Luteinizing hormone-induced Akt phosphorylation and androgen production are modulated by MAP Kinase in bovine theca cells. *J Ovarian Res* 2, 1-8.

Galay-Burgos, M., Gearly, C., Navarro-Martín, L., Piferrer, F., Zanuy, S., Sweeney, G. (2006). Cloning of the promoter from the gonadal aromatase gene of the European sea bass and identification of single nucleotide polymorphisms. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 145, 47-53.

Galay-Burgos, M., L, L.L., Mylonas, C., Canario, A., Zanyu, S., Sweeney, G. (2004). Analysis of the Sox gene family in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp Biochem Physiol A* 137, 279-284.

García-López, Á., Bogerd, J., Granneman, J.C.M., van Dijk, W., Trant, J.M., Taranger, G.L., Schulz, R.W. (2008). Leydig cells express FSH receptors in African catfish. *Endocrinology* 150, 357-365.

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

Garnett, K., Wang, J., Roy, S.K. (2002). Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: follicle stage-specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol and progesterone. *Biol Reprod* 67, 1593-1604.

Gen, K., Okuzawa, K., Senthilkumaran, B., Tanaka, H., Moryama, S., Kagawa, H. (2000). Unique expression of gonadotropin-I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. *Biol Reprod* 63, 308-319.

Gen, K., Yamaguchi, S., Okuzawa, K., Kumakura, N., Tanaka, H., Kagawa, H. (2003). Physiological roles of FSH and LH in red seabream, *Pagrus major*. *Fish Physiol Biochem* 28 77-80.

- Gerits, N., Kostenko, S., Shirayev, A., Johannessen, M., Moens, U. (2008). Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathway: Comradeship and hostility. *Cel Signal* 20, 1592-1607.
- Goldsmith, Z.G., Dhanasekaran, D.N. (2007). G Protein regulation of MAPK networks. *Oncogene* 26, 3122-3142.
- Gómez, A., Volff, J.-N., Hornung, U., Scharl, M., Wellbrock, C. (2004). Identification of a second egfr gene in *Xiphophorus* uncovers an expansion of the epidermal growth factor receptor family in fish. *Mol Biol Evol* 21, 266-275.
- Gómez, J.M., Weil, C., Ollitrault, M., Le Bail, P.Y., Breton, B., Le Gac, F. (1999). Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 113, 16.
- Gomez-Chiarri, M., Chiaverini, L.A. (1999). Evaluation of eukaryotic promoters for the construction of DNA vaccines for aquaculture. *Genet Anal-Biomol E* 15, 121-124.
- González-Martínez, D., Zmora, N., Zanyu, S., Sarasquete, C., Elizur, A., Kah, O., Muñoz-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*). *J Chem Neuroanat* 23, 255-267.
- González-Robayna, I., Falender, A.E., Ochsner, S., Richards, J.S. (2000). Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein Kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase- independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 14, 1283-1900.
- González-Robayna, I.J., Alliston, T.N., Buse, P., Firestone, G.L., Richards, J.S. (1999). Functional and subcellular changes in the A-kinase-signaling pathway: Relation to aromatase and Sgk expression during the transition of granulosa cells to luteal cells. *Mol Endocrinol* 13, 1318-1337.
- Gothelf, A., Hojman, P., Gehl, J. (2010). Therapeutic levels of erythropoietin (EPO) achieved after gene electrotransfer to skin in mice. *Gene Ther* 17, 1077-1084.
- Graves, L.M., Bornfeldt, K.E., Raines, E.W., Potts, B.C., Macdonald, S.G., Ross, R., Krebs, E.G. (1993). Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1, 4.
- Grier, H. (1981). Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer Zool* 21, 21.
- Grier, H.J., Taylor, R.G. (1998). Testicular maturation and regression in the common snook. *J Fish Biol* 53, 521-542.
- Griswold, M.D. (1998). The role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell and Developmental Biology* 9, 411-416.

Griswold, M.D. (2005). Perspective on the function of Sertoli Cells. In Sertoli Cell Biology, M.K. Skinner, and M.D. Griswold, eds. (Elsevier Academic Press), pp. 15-19.

Griswold, M.D., McLean, D., Jimmy, D.N., Ph.D, Tony, M.P., Ph.D, Donald, W.P., Ph.D, John, R.G.C., D.Sc, et al. (2006). The Sertoli Cell. In Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition) (St Louis: Academic Press), pp. 949-975.

Guzmán, J.M., Cal, R., García-López, Á., Chereguini, O., Kight, K., Olmedo, M., Sarasquete, C., Mylonas, C.C., Peleteiro, J.B., Zohar, Y., et al. (2011). Effects of *in vivo* treatment with the dopamine antagonist pimozide and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) on the reproductive axis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Comp Biochem Physiol A 158, 235-245.

Gyles, S.L., Burns, C.J., Whitehouse, B.J., Sugden, D., Marsh, P.J., Persaud, S.J., Jones, P.M. (2001). ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis through transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene. J Biol Chem 276, 34888-34895.

Halm, S., Ibáñez, A.J., Tyler, C.R., Prat, F. (2008). Molecular characterisation of growth differentiation factor 9 (gdf9) and bone morphogenetic protein 15 (bmp15) and their patterns of gene expression during the ovarian reproductive cycle in the European sea bass. Mol Cell Endocrinol 291, 103-111.

Halm, S., Martinez-Rodriguez, G., Rodriguez, L., Prat, F., Mylonas, C., Carrillo, M., Zanyu, S. (2004). Cloning, characterization, and expression of three oestrogen receptors (ER, ER1 and ER2) in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Mol Cel Endocrinol 223, 63-75.

Halm, S., Rocha, A., Miura, T., Prat, F., Zanuy, S. (2007). Anti-Müllerian hormone (AMH/AMH) in the European sea bass: Its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms. Gene 388, 148-158.

Hansen, E., Fernandes, K., Goldspink, G., Butterworth, P., Umeda, P.K., Chang, K.C. (1991). Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. FEBS Letters 290, 73-76.

Hassin, S., Gothilf, Y., Blaise, O., Zohar, Y. (1998). Gonadotropin-I and -II subunit geneexpression of male striped bass (*Morone saxatilis*) after gonadotropin-releasing hormone analogue injection: quantitation using an optimized ribonuclease protection assay. Biol Reprod 58, 1233-1240.

Hauet, T., Yao, Z., Bose, H., Wall, C.T., Han, Z., Li, W., Hales, D.B., Miller, W.L., Culty, M., Papadopoulos, V. (2005). Peripheral-type benzodiazepine receptor-mediated action of steroidogenic acute regulatory protein on cholesterol entry into leydig cell mitochondria. Mol Endocrinol 19, 540-556.

Hayakawa, Y., Morita, T., Kitamura, W., Kanda, S., Banba, A., Nagaya, H., Hotta, K., Sohn, Y.C., Yoshizaki, G., Kobayashi, M. (2008). Biological activities of single-chain goldfish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. Aquaculture 274, 408-415.

Haywood, M., Spaliviero, J., Jimenez, M., King, N.J.C., Handelsman, D.J., Allan, C.M. (2003). Sertoli and germ cell development in hypogonadal (hpg) mice expressing transgenic follicle-stimulating hormone alone or in combination with testosterone. Endocrinology 144, 509-517.

Hearn, M.T., Gomme, P.T. (2000). Molecular architecture and biorecognition processes of the cystine knot protein superfamily: part I. The glycoprotein hormones. J Mol Recognit 13, 223-278.

- Heller, L., Jaroszeski, M.J., Coppola, D., Pottinger, C., Gilbert, R., Heller, R. (2000). Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas *in vivo*. *Gene Ther* 7, 826-829.
- Heppel, J., Lorenzen, N., Armstrong, N.K., Wu, T., Lorenzen, E., Einer-Jensen, K., Schorr, J., Davis, H.L. (1998). Development of DNA vaccines for fish: vector design, intramuscular injection and antigen expression using viral haemorrhagic septicaemia virus genes as model. *Fish Shellfish Immunol* 8, 229-386.
- Houssay, B.A. (1930). Acción sexual de la hipófisis en los peces y reptiles. *Rev Soc Arg Biol* 106, 3, 686-688
- Houwing, S., Kamminga, L.M., Berezikov, E., Cronembold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filippov, D.V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C.B., et al. (2007). A Role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish. *Cell* 129, 69-82.
- Hunzicker-Dunn, M., Maizels, E. (2006). FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: Branching out from protein kinase A. *Cell Signal* 18, 1351-1359.
- Ikeuchi, T., Todo, T., Kobayashi, T., Nagahama, Y. (2001). Two subtypes of androgen and progesterone receptors in fish testes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129, 449-455.
- Iwai, T., Yoshii, A., Yokota, T., Sakai, C., Hori, H., Kanamori, A., Yamashita, M. (2006). Structural components of the synaptonemal complex, SYCP1 and SYCP3, in the medaka fish *Oryzias latipes*. *Exp Cell Res* 312, 2528-2537.
- Jackson, K., Goldberg, D., Ofir, M., Abraham, M., Degani, G. (1999). Blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) gonadotropic β subunits (I and II) cDNA sequences and expression during oogenesis. *J Mol Endocrinol* 23, 177-187.
- Jiang, J.Q., Wang, D.S., Senthilkumaran, B., Kobayashi, T., Kobayashi, H.K., Yamaguchi, A., Ge, W., G, Y., Y, N. (2003). Isolation, characterization and expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 cDNAs from the testes of Japanese eel (*Anguilla japonica*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Mol Endocrinol* 31, 305-315.
- Jo, Y., King, R., Khan, S., Stocco, D.M. (2005). Involvement of protein kinase C and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent kinase in steroidogenic acute regulatory protein expression and steroid biosynthesis in Leydig cells. *Biol Reprod* 73, 244-255.
- Jorissen, R., Walker, F., Pouliot, N., Garret, T., Ward, C., Burgess, A. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284.
- Josso, N., Racine, C., di Clemente, N., Rodolfo, R., Xavier, F. (1998). The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development. *Mol Cell Endocrinol* 145, 3-7.
- Kagawa, H., Gen, K., Okuzawa, K., Tanaka, H. (2003). Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*. *Biol Reprod* 68, 1562-1568.

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

Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L., Vaillant, C., JJ., L. (2007). GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. Gen Comp Endocrinol 153, 346-364.

Kajimura, S., Yoshiura, Y., Suzuki, M., Aida, K. (2001). cDNA cloning of two gonadotropin beta subunits (GTH-Ib and -IIb) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Gen Comp Endocrinol 122, 117-129.

Kallen, C.B., Arakane, F., Christenson, L.K., Watari, H., Devoto, L., JF, S.I. (1998a). Unveiling the mechanism of action and regulation of the steroidogenic acute regulatory protein. Mol Cel Endocrinol 145, 39-45.

Kallen, C.B., Billheimer, J.T., Summers, S.A., Staybrook, S.E., Lewis, M., JF, S.I. (1998b). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein. J Bio Chem 273, 26285-26287.

Kamei, H., Aida, K., Kaneko, T. (2006). *In vivo* gonadotropic effects of recombinant Japanese eel follicle-stimulating hormone. Aquaculture 261, 771-775.

Kanda, S., Akazome, Y., Mitani, Y., Okubo, K., Oka, Y. (2013). Neuroanatomical evidence that kisspeptin directly regulates isotocin and vasotocin neurons. PLoS One 8, e62776.

Kassab, M., Abd-Elmaksoud, A., Ali, M.A. (2007). Localization of the epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in the bovine testis. J Mol Hist 38, 207-213.

Kawamura, K., Kumagai, J., Sudo, S., Chun, S.Y., Pisarska, M., Morita, H., Toppari, J., Fu, P., Wade, J.D., Bathgate, R.A., et al. (2004). Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. Proc Natl Acad Sci USA 101, 73223-7328.

Kawauchi, H., Suzuki, K., Nagahama, Y., Adachi, N., Naito, N., Nakai, Y., Yoshimura, F., Gorbman, A. (1986). Occurrence of two distinct gonadotropins in chum salmon pituitary. In *pars distalis* of the pituitary gland: structure, function and regulation (Amsterdam: Elsevier), pp. 383–390.

Kay, M.A. (2011). State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. Reprod Dom Anim 12, 316-328.

Kazeto, Y., Ijiri, S., Place, A.R., Zohar, Y., Trant, J.M. (2001). The 5'-Flanking Regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. Biochem Bioph Res Co 288, 503-508.

Kazeto, Y., Kohara, M., Tosaka, R., Gen, K., Yokoyama, M., Miura, C., Miura, T., Adachi, S., Yamauchi, K. (2012). Molecular characterization and gene expression of Japanese eel (*Anguilla japonica*) gonadotropin receptors. Zool Sci 29, 204-211.

Keeney, D.S., Mason, J.I. (1992). Expression of testicular 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-4-isomerase: regulation by luteinizing hormone and forskolin in Leydig cells of adult rats. Endocrinology 130, 2007-2015.

- Kime, D.E. (1993). Classical and non-classical reproductive steroids in fish. *Rev Fish Biol Fish* 3, 160-180.
- Kitsis, R., Buttrick, P.M., Macnally, E.M., Kaplan, M.L., Leinwand, L. (1991). Hormonal modulation of a gene injected into rat heart *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 4138-4142.
- Klinman, D.M., Conover, J., Leiden, J.M., Rosenberg, A.S., Sechler, J.M.G. (1999). Safe and effective regulation of hematocrit by gene gun administration of an erythropoietin-encoding DNA plasmid. *Hum Gene Ther* 10, 659-665.
- Ko, H., Park, W., Kim, D.-J., Kobayashi, M., Sohn, Y.C. (2007). Biological activities of recombinant Manchurian trout FSH and LH: their receptor specificity, steroidogenic and vitellogenic potencies. *J Mol Endocrinol* 38, 99-111.
- Kobayashi, M., Hayakawa, Y., Park, W., Banba, A., Yoshizaki, G., Kumamaru, K., Kagawa, H., Kaki, H., Nagaya, H., Sohn, Y.C. (2010). Production of recombinant Japanese eel gonadotropins by baculovirus in silkworm larvae. *Gen Comp Endocrinol* 167, 379-386.
- Kobayashi, M., Morita, T., Ikeguchi, K., Yoshizaki, G., Suzuki, T., Watabe, S. (2006). *In vivo* biological activity of recombinant goldfish gonadotropins produced by baculovirus in silkworm larvae. *Aquaculture* 256, 433-442.
- Kobayashi, M., Stacey, N.E. (1990). Effects of ovariectomy and steroid hormone implantation on serum gonadotrophin levels in female goldfish. *Zool Sci* 7, 21-27.
- Koulisch, S., Kramer, C., Grier, H. (2002). Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei, Labridae). *J Morph*, 254292-254311.
- Kumar, R.S., Ijiri, S., Trant, J.M. (2001a). Molecular biology of the channel catfish gonadotropin receptors: 2. Complementary DNA cloning, functional expression, and seasonal gene expression of the follicle-stimulating hormone receptor. *Biol Reprod* 65, 710-717.
- Kumar, R.S., Shigeho, I., Trant, J.M. (2001b). Molecular biology of channel catfish gonadotropin receptors: 1. cloning of a functional luteinizing hormone receptor and preovulatory induction of gene expression. *Biol Reprod* 64, 1010-1018.
- Kumar, R.S., Trant, J.M. (2004). Hypophyseal gene expression profiles of FSH β , LH β and glycoprotein hormone- α subunits in *Ictalurus punctatus* throughout a reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* 136, 82-89.
- Kurath, G. (2008). Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 27, 175-196.
- Kusakabe, M., Nakamura, I., Evans, J., Swanson, P., Young, G. (2006). Changes in mRNAs encoding steroidogenic acute regulatory protein, steroidogenic enzymes and receptors for gonadotropins during spermatogenesis in rainbow trout testes. *J Endocrinol* 189, 541-554.
- Kusakabe, M., Zuccarelli, M.D., Nakamura, I., Young, G. (2009). Steroidogenic acute regulatory protein in white sturgeon (*Acipenser transmontanus*): cDNA cloning, sites of expression and

transcript abundance in corticosteroidogenic tissue after an acute stressor. *Gen Comp Endocrinol* 162, 233-240.

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

Laisney, J.A., Braasch, I., Walter, R., Meierjohann, S., Scharl, M. (2010). Lineage-specific co-evolution of the Egf receptor/ligand signaling system. *BMC Evol Biol* 10, 16.

Lala, D.S., Rice, D., Parke, R.K. (1992). Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor. *Mol Endocrinol* 6, 1249-1258.

Larsen, D.A., Swanson, P. (1997). Effects of gonadectomy on plasma gonadotropins I and II in Coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen Comp Endocrinol* 108, 152-160.

Lassiter, C.S., Kelley, B., Linney, E. (2002). Genomic structure and embryonic expression of estrogen receptor beta a (ERBa) in zebrafish (*Danio rerio*). *Gene* 299, 141-151.

Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F., Stehelin, D. (1992). Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO* 11, 1003-1013.

Le Menn, F., Cerdá, J., Babin, P. (2007). Ultrastructural aspects of the ontogeny on differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. In *The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications*, J.C.y.E.L. P.J.Babin, ed. (Netherlands: Springer), pp. 1-37.

Leal, M.C., de Waal, P.P., García-López, n., Chen, S.X., Bogerd, J., Schulz, R.W. (2009). Zebrafish primary testis tissue culture: An approach to study testis function ex vivo. *Gen Comp Endocrinol* 162, 134-138.

Lee, D.K., Chang, C. (2003a). Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. *J Clin Endoc Metab* 88, 4043-4054.

Lee, H.J., Chang, C. (2003b). Recent advances in androgen receptor action. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 60, 1613-1622.

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

Lesbordes, J.C., Bordet, T., Haase, G., Castelnau-Ptakhine, L., Rouhani, S., Gilgenkrantz, H., Kahn, A. (2002). *In vivo* electrotransfer of the cardiotrophin-1 gene into skeletal muscle slows down progression of motor neuron degeneration in pmn mice. *Hum Mol Genet* 11, 1615-1625.

Leung, P., Steele, G. (1992). Intracellular signaling in the gonads. *Endocrine Reviews* 13, 476-498.

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

Levy, M.Y., Barron, L.G., Meyer, K.B., Szoca Jr, F.C. (1995). Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood. *Gene Ther* 3, 201-211.

- Li, J., Liu, Z., Wang, D., Cheng, C.H. (2011). Insulin-like growth factor 3 is involved in oocyte maturation in zebrafish. *Biol Reprod* 84, 476-486.
- Li, S. (2008). *Electroporation Protocols: Preclinical and clinical gene medicine* (Totowa, New Jersey: Humana Press).
- Li, Y.Y., Inoue, K., Takei, Y. (2009). Steroidogenic acute regulatory protein in eels: cDNA cloning and effects of ACTH and seawater transfer on its mRNA expression. *Zool Sci* 20, 211-219.
- Lin, S.B., Fan, T.W., Wu, J.L., Hui, C.F., Chen, J.Y. (2009). Immune response and inhibition of bacterial growth by electrotransfer of plasmid DNA containing the antimicrobial peptide, epinecidin-1, into zebrafish muscle. *Fish Shellfish Immun* 26, 451-458.
- Lin, T., Haskell, J., Vinson, N., Terracio, L. (1986). Direct stimulatory effects of insulin-like growth factor-I on Leydig cell steroidogenesis in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* 137, 950-956.
- Liu, L., Ge, W. (2007). Growth differentiation factor 9 and its spatiotemporal expression and regulation in the zebrafish ovary. *Biol Reprod* 76, 294-302.
- Liu, Y.C., Kato, Y., Inoue, K., Tanaka, S., Kurosumi, K. (1988). Co-localization of LHb and FSHb mRNAs in the porcine anterior pituitary by hybridization with biotinylated probes. *Biochem Biophys Res Commun* 154, 80-84.
- Liu, Z.J., Zhu, Z.Y., Roberg, K., Faras, A., Guise, K., Kapuscinski, A.R., Hackett, P.B. (1990). Isolation and characterization of beta-actin gene of carp (*Cyprinus carpio*). *DNA Seq* 1, 125-136.
- Livak, K.J., 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.
- Loir, M. (1994). *In vitro* approach to the control of spermatogonia proliferation in the trout. *Mol Cell Endocrinol* 102, 141-150.
- Loir, M. (1999). Spermatogonia of rainbow trout: II. *In vitro* study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. *Mol Reprod Dev* 53, 434-442.
- Loir, M., LeGac, F. (1994). Insulin-like growth factor-I and -II binding and action on DNA synthesis on rainbow trout spermatogonia and spermatocytes. *Biol Reprod* 51, 1154-1162.
- Lokman, P., George, K., S, D., Algie, M., G, Y. (2007). 11-Ketotestosterone and IGF-I increase the size of previtellogenic oocytes from shortfinned eel, *Anguilla australis*, *in vitro*. *Reproduction* 133, 955-967.
- Lorenzen, N., Cupit, P.M., Einer-Jensen, K., Lorenzen, E., Ahrens, P., Secombes, C.J., Cunningham, C. (2000). Immunoprophylaxis in fish by injection of mouse antibody genes. *Nat Biotech* 18, 1177-1180.
- Lubenzs, E., Young, G., Bobe, J., Cerdá, J. (2010). Oogenesis in teleosts: how fish eggs are formed. *Gen Comp Endocrinol* 165, 367-390.
- Lucas, M.L., Heller, R. (2001). Immunomodulation by electrically enhanced delivery of plasmid DNA encoding IL-12 to murine skeletal muscle. *Mol Ther* 3, 47-53.

- Luckenbach, J.A., Dickey, J.T., Swanson, P. (2011). Follicle-stimulating hormone regulation of ovarian transcripts for steroidogenesis-related proteins and cell survival, growth and differentiation factors *in vitro* during early secondary oocyte growth in coho salmon. *Gen Comp Endocrinol* 171, 52-63.
- Luna, C., Colás, C., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. (2012). A novel epidermal growth factor-dependent extracellular signal-regulated MAP kinase cascade involved in sperm functionality in sheep. *Biol Reprod* 87, 93
- Maguire, S.M., Tribley, W.A., Griswold, M.D. (1997). Follicle-stimulating hormone (FSH) regulates the expression of FSH receptor messenger ribonucleic acid in cultured Sertoli cells and in hypophysectomized rat testis. *Biol Reprod* 56, 1106-1111.
- Mañanós, E., Carrillo, M., Sorbera, L.A., Mylonas, C., Asturiano, J.F., Bayarri, M.J., Zohar, J., Zanyu, S. (2002). Luteinizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue. *J Fish Biol* 60, 328-339.
- Mañanós, E., Swanson, P., Zohar, Y., Stubblefield, J. (1997). Purification of gonadotropin II from a teleost fish, the hybrid striped bass, and development of a specific enzyme-linked immunosorbent assay. *Gen Comp Endocrinol* 108, 209-222.
- Manna, P.R., Eubank, D.W., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Stocco, D.M. (2003a). Transcriptional regulation of the mouse steroidogenic acute regulatory protein gene by the cAMP response-element binding protein and steroidogenic factor 1. *J Mol Endocrinol* 30, 381-397.
- Manna, P.R., Wang, X.J., Stocco, D.M. (2003b). Involvement of multiple transcription factors in the regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *Steroids* 68, 1125-1134.
- Manna, P.R., Jo, Y., Stocco, D.M. (2007). Regulation of Leydig cell steroidogenesis by extracellular signal-regulated kinase 1/2: role of protein kinase A and protein kinase C signaling. *J Endocrinol* 193, 53-63.
- Martinelle, N., Holst, M., Soder, O., Svechnikov, K. (2004). Extracellular signal-regulated kinases are involved in the acute activation of steroidogenesis in immature rat Leydig cells by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 145, 4629-4634.
- Martínez-López, A., Encinas, P., García-Valtanen, P., Gómez-Casado, E., Coll, J.M., Estepa, A. (2013). Improving the safety of viral DNA vaccines: development of vectors containing both 5' and 3' homologous regulatory sequences from non-viral origin. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 3007-3016.
- Mason, J.I., Keeney, D.S., Bird, I.M., Rainey, W.E., Morohashi, K.I., Leers-Sucheta, S., Melner, M.H. (1997). The regulation of 3-hydroxysteroid dehydrogenase expression. *Steroids* 62, 164-168.
- Mateos, J., Mañanos, E., Carrillo, M., Zanuy, S. (2002). Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean Sea bass. *Comp Biochem Physiol* 132, 75-86.
- Mateos, J., Mañanós, E., Martínez-Rodríguez, G., Carrillo, M., Quérat, B., Zanuy, S. (2003). Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (α , FSH β and LH β) and their expression during the reproductive cycle. *Gen Comp Endocrinol* 133, 216-232.

- Mateos, J., Mañanós, E., Swanson, P., Carrillo, M., Zanuy, S. (2006). Purification of luteinizing hormone (LH) in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and development of a specific immunoassay. *Cien Mar* 32, 271-283.
- Matta, S.L., Vilela, D.A., Godinho, H.P., França, L.R. (2002). The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology* 143, 970-978.
- Maugars, G., Schmitz, M. (2008). Gene expression profiling during spermatogenesis in early maturing male Atlantic salmon parr testes. *Gen Comp Endocrinol* 159, 178-187.
- Mazón, M.J., Gómez, A., Yilmaz, O., Carrillo, M., Zanuy, S. (2014). Administration of follicle-stimulating hormone *in vivo* triggers testicular recrudescence of juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol Reprod* 20, 1-6.
- Mazón, M.J., Zanuy, S., Muñoz, I., Carrillo, M., Gómez, A. (2013). Luteinizing hormone plasmid therapy results in long-lasting high circulating Lh and increased sperm production in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol Reprod* 88, 6-10.
- McDowell, E.M., Trump, E.M. (1976). Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 100, 405-413.
- McLachlan, R.I., O'Donnell, L., Meachem, S.J., Stanton, P.G., de Kretser, D.M., Pratis, K., Robertson, D.M. (2002). Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog Horm Res* 57, 149-179.
- Meiri, I., Knibb, W.R., Zohar, Y., Elizur, A. (2004). Temporal profile of b follicle-stimulating hormone, b luteinizing hormone, and growth hormone gene expression in the protandrous hermaphrodite, gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen Comp Endocrinol* 137, 288-299.
- Melamed, P., Gur, G., Rosenfeld, H., Elizur, A., Yaron, Z. (1997). The mRNA levels ofGtH-Ib, GtH-IIb and GH in relation to testicular development and testosterone treatment in pituitary cells of male tilapia. *Fish Physiol Biochem* 17, 93-98.
- Méndez, E., Montserrat, N., Planas, J.V. (2005). Modulation of the steroidogenic activity of luteinizing hormone by insulin and insulin-like growth factor-I through interaction with the cAMP-dependent protein kinase signaling pathway in the trout ovary. *Mol Cel Endocrinol* 229, 49-56.
- Méndez, M.C., Ramírez, M., Varela, A.R., Chávez, B., Pedernera, E. (2003). Follicle-stimulating hormone increases cell proliferation in the ovary and the testis of the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 133, 181-188.
- Méndez, M.C., Tamez, L., Cándido, A., Reyes-Esparza, J.A. (1998). Follicle stimulating hormone increase somatic and germ cell number in the ovary during chick embryo development. *Gen Comp Endocrinol* 111, 207-215.
- Miao, C.H., Ohashi, K., Patijn, G.A., Meuse, L., Ye, X., Thompson, A.R., Kay, M.A. (2000). Inclusion of the hepatic locus control region, an intron, and untranslated region increases and stabilizes hepatic factor IX gene expression *in vivo* but not *in vitro*. *Mol Ther* 1, 522-532.

Mikalsen, A.B., Torgersen, J., Aleström, P., Hellemann, A., Koppang, E., Rimstad, E. (2004). Protection of Atlantic salmon *Salmo salar* against infectious pancreatic necrosis after DNA vaccination. *Dis Aquat Organ* 60, 11-20.

Mir, M.L. (2008). Application of electroporation Gene therapy: Past, current and future. In *Electroporation Protocols: Preclinical and Clinical Gene Medicine*, S. Li, ed.

Mitter, K., Kotoulas, G., Magoulas, A., Mulero, V., Sepulcre, P., Figueras, A., Novoa, B., Sarropoulou, E. (2009). Evaluation of candidate reference genes for QPCR during ontogenesis and of immune-relevant tissues of European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp Biochem Phys B* 153, 340-347.

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

Miura, T., Masato, H., Yuiichi, O., Takashi, O., Miura, C. (2006). Progesterone is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel. *PNAS* 103 7333-7338.

Miura, T., Miura, C. (2003). Molecular control mechanism of fish spermatogenesis. *Fish Physiol Biochem* 28 181-186.

Miura, C., Miura, T., Yamashita, M. (2002a). PCNA Protein expression during spermatogenesis of the Japanese Eel (*Anguilla japonica*). *Zool Sci* 19, 87-91.

Miura, T., Chiemi, M., Yasuko, K., Kohei, Y. (2002b). Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Development* 129 2689-2697.

Miura, C., Miura, T., Kudo, N., Yamashita, M., Yamauchi, K. (1999). cDNA cloning of a stage-specific gene expressed during HCG-induced spermatogenesis in the Japanese eel. *Dev Growth Differ* 41, 463-471.

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

Miura, T., Miura, C., Yamauchi, K., Nagahama, Y. (1995). Human recombinant activin induces proliferation of spermatogonia *in vitro* in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish Sci* 61, 434-437.

Miura, T., Kohei, Y., Hiroya, T., Nagahama, Y. (1991a). Human chorionic gonadotropin induces all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Dev Biol* 146, 258-262.

Miura, T., Yamauchi, K., Takashi, H., Nagahama, Y. (1991b). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc Nat Acad Sci* 88, 5774-5778.

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

- Miyazaki, S., Miyazaki, J.i. (2008). *In vivo* DNA electrotransfer into muscle. *Develop Growth Differ* 50, 479-483.
- Molés, G. (2011). Caracterización biológica de las gonadotrofinas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) y desarrollo de herramientas biotecnológicas e inmunológicas para su estudio (Valencia: Universidad de Valencia).
- Molés, G., Gómez, A., Carrillo, M., Rocha, A., Mylonas, C.C., Zanuy, S. (2011a). Determination of fsh quantity and bioactivity during sex differentiation and oogenesis in european sea bass. *Biol Reprod* 85, 848-857.
- Molés, G., Gómez, A., Carrillo, M., Zanuy, S. (2012). Development of a homologous enzyme-linked immunosorbent assay for European sea bass FSH. Reproductive cycle plasma levels in both sexes and in yearling precocious and non-precocious males. *Gen Comp Endocrinol* 176, 70-78.
- Molés, G., Zanuy, S., Muñoz, I., Crespo, B., Martínez, I., Mañanós, E., and Gómez, A. (2011b). Receptor specificity and functional comparison of recombinant sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonadotropins (Fsh and Lh) produced in different host systems. *Biol Reprod* 84, 1171-1181.
- Molés, G., Gómez, A., Rocha, A., Carrillo, M., Zanuy, S. (2008). Purification and characterization of follicle-stimulating hormone from pituitary glands of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen Comp Endocrinol* 158, 68-76
- Monserrat, N., Gonzalez, A., Mendez, E., Piferrer, F., Planas, J. (2004). Effects of follicle stimulating hormone on estradiol-17 β production and P-450 aromatase (CYP 19) activity and mRNA expression in brown trout vitellogenic ovarian follicles *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol* 137, 123-131.
- Montero, M., Le Belle, N., King, J.A., Millar, R.P., 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.
- Morais, R.D., Nobrega, R.H., Gomez-Gonzalez, N.E., Schmidt, R., Bogerd, J., Franca, L.R., Schulz, R.W. (2013). Thyroid hormone stimulates the proliferation of Sertoli cells and single type A spermatogonia in adult zebrafish (*Danio rerio*) testis. *Endocrinology* 154, 4365-4376.
- Morohashi, K.I., Zanger, U., Honda, S.I., Hara, M., Waterman, M., Omura, T. (1993). Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. *Mol Endocrinol* 7, 1196-1203.
- Morohashi, K.I., Omura, T. (1996). Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *FASEB J* 10, 1569-1577.
- Moyle, W.R., Campbell, R.K., Myers, R.V., Bernard, M.P., Han, Y., Wang, X. (1994). *Fishes: an introduction to ichthyology*. (Englewood Cliffs, N.J: Prentice Hall).
- Mukherjee, A., Park-Sarge, O.K., Mayo, K.E. (1996). Gonadotropins induce rapid phosphorylation of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 137, 3234-3245.

- Mukhopadhyay, A.K., Bohnet, H.G., Leidenberger, F.A. (1984). Phorbol esters inhibit LH stimulated steroidogenesis by mouse Leydig cells. *Biochem Bioph Res Co* 119, 1062-1067.
- Mumper, R.J., Wang, J., L. Klakamp, S., Nitta, H., Anwer, K., Tagliaferri, F., Rolland, A.P. (1998). Protective interactive noncondensing (PINC) polymers for enhanced plasmid distribution and expression in rat skeletal muscle. *J Control Release* 52, 191-203
- Muñoz, I., Zanuy, S., Mazón, M.J., Carrillo, M., Gómez, A. (2013). Somatic gene transfer in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Optimal fish conditions and exogenous control of foreign genes. *Aquaculture* 388–391, 60-69.
- Muñoz-Cueto, J.A. (2009). Cerebro y reproducción en peces: bases neuronales y neuroendocrinas. In *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura* (Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura), pp. 25-75.
- Mylonas, C.C., Fostier, A., Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen Comp Endocrinol* 165, 516-534.
- Mylonas, C.C., Tabata, Y., Langer, R.Z., Y (1995). Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone (GnRH), for inducing ovulation and spermiation in fish. *J Controll Release* 35, 23-34.
- Nader, M., Miura, T., Ando, N., Miura, C., Yamauchi, K. (1999). Recombinant human insulin-Like growth factor I stimulates all stages of 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, *In Vitro*. *Biol Reprod* 61, 944-947.
- Nagahama, Y. (1997). 17 α ,20 β -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62, 190-196.
- Nagahama, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J Dev Biol* 38, 217-229
- Nagahama, Y. (1983a). The functional morphology of teleost gonads. In *Fish physiology*, Hoar W.S., D.J. Randall, and E.M. Donaldson eds. (Academia Press), pp. 223-275.
- Nagahama, Y. (1983b). The functional morphology of teleost gonads. In *Fish physiology*, R. Hoar W.S., D.J., Donaldson, E.M., ed. (New Cork: Academia Press), pp. 223-275.
- Nagahama, Y., Yamashita, M. (2008). Regulation of oocyte maturation in fish. *Develop Growth Differ* 50, 195-219.
- Nakamura, I., Evans, J.C., Kusakabe, M., Nagahama, Y., Young, G. (2005). Changes in steroidogenic enzyme and steroidogenic acute regulatory protein messenger RNAs in ovarian follicles during ovarian development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 144, 224-231.
- Nakazumi, H., Sasano, H., Maehara, I., Orikasa, S. (1996). Transforming growth factor-alpha, epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in human testis obtained from biopsy and castration: Immunohistochemical study. *Tohoku J Exp Med* 178, 381-388.
- Navarro-Martin, L., Vinas, J., Ribas, L., Diaz, N., Gutierrez, A., Di Croce, L., Piferrer, F. (2011). DNA methylation of the gonadal aromatase (cyp19a) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. *PLoS genetics* 7, e1002447.

- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P.H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* 1, 841-845.
- Niederberger, C., Shubhada, S., Kim, S., Lamb, D. (1993). Paracrine factors and the regulation of spermatogenesis. *World J Urol* 11, 120-128.
- Niidome, T., Huang, L. (2002). Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* 9, 1647-1652.
- Nishimura, R., Shibaya, M., Skarzynski, D.J., Okuda, K. (2004). Progesterone stimulation by LH involves the phospholipase-C pathway in bovine luteal cells. *J Reprod Develop* 50, 257-261.
- Oba, Y., Hirai, T., Yoshiura, Y., Yoshikuni, M., Kawauchi, H., Nagahama, Y. (1999a). Cloning, functional characterization, and expression of a gonadotropin receptor cDNA in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochem Biophys Res Commun* 263, 584-590.
- Oba, Y., Hirai, T., Yoshiura, Y., Yoshikuni, M., Kawauchi, H., Nagahama, Y. (1999b). The duality of fish gonadotropin receptors: cloning and functional characterization of a second gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochem Biophys Res Commun* 265, 366-371.
- Odell, W.D., Swerdloff, R.S., Bain, J. (1974). The effect of sexual maturation on testicular response to LH stimulation of testosterone secretion in the intact rat. *Endocrinology* 95, 1380-1384.
- Odell, W.D., Swerdloff, R.S., Jacobs, H.S., Hescoc, M.A. (1973). FSH induction of sensitivity to LH: one cause of sexual maturation in the male rat. *Endocrinology* 92, 160-165.
- Ohta, H., Tanaka, H. (1997). Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 153, 123-134.
- Ohta, T., Miyake, H., Miura, C., Kamei, H., Aida, K., Miura, T. (2007). Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biol Reprod* 77, 970-977.
- Otis, M., Gallo-Payet, N. (2007). Role of MAPKs in angiotensin II-induced steroidogenesis in rat glomerulosa cells. *Mol Cel Endocrinol* 265-266, 126-130.
- Ozaki, Y., Higuchi, M., Miura, C., Yamaguchi, S., Tozawa, Y., Miura, T. (2006). Roles of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in fish spermatogenesis. *Endocrinology* 147, 5139-5146.
- Pace, M.C., Thomas, P. (2005). Steroid-Induced oocyte maturation in atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) is dependent on activation of the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Biol Reprod* 73, 988-996.
- Papadopoulos, V. (1993). Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr Rev* 14, 222-240.
- Parakh, T., Hernandez, J., Grammer, J.C., Weck, J., Hunzicker, M., Zeleznik, J., Nilson, J. (2006). Follicle-stimulating hormone cAMP regulation of aromatase gene expression requires acatenin. *PNAS* 103, 12435-12440.

- Parenti, L., Grier, H. (2004). Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr Comp Biol* 44, 15.
- Park, T., Su, Y.Q., Ariga, M., Law, E., Jin, C., Conti, M. (2004). EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulation follicle. *Science* 303, 682-685.
- Parthasarathy, C., Balasubramanian, K. (2008). Effects of corticosterone deficiency and its replacement on leydig cell steroidogenesis. *J Cell Biochem* 104, 1671-1683.
- Pasapera, A., Jimenez-Aguilera, M., Chauchereau, A., Milgrom, E., Olivares, A., Uribe, A., Gutierrez Sagal, R., Ulloa Aguirre, A. (2005). Effects of FSH and 17-estradiol on the transactivation of estrogen-regulated promoters and cell proliferation in L cells. *J Steroid Biochem* 94, 289-302.
- Patiño, R., Sullivan, C.V. (2002). Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleosts fish. *Fish Physiol Biochem* 26, 57-70.
- Patiño, R., Thomas, P. (1990). Characterization of membrane receptor activity for 17 alpha, 20 beta, 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in ovaries of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Gen Comp Endocrinol* 78, 204-217.
- Paul, S., Kundu, S., Pramanick, K., Bandyopadhyay, A., Mukherjee, D. (2010). Regulation of ovarian steroidogenesis *in vitro* by gonadotropin in common carp *Cyprinus carpio*: interaction between calcium- and adenylate cyclase-dependent pathways and involvement of ERK signaling cascade. *J Mol Endocrinol* 45, 207-218.
- Paul, S., Pramanick, K., Kundu, S., Bandyopadhyay, A., Mukherjee, D. (2009). Involvement of PI3 kinase and MAP kinase in IGF-I- and insulin-induced oocyte maturation in *Cyprinus carpio*. *Mol Cell Endocrinol* 309, 93-100.
- Pentikäinen, V., Erkkilä, K., Suomalainen, L., Parvinen, M., Dunkel, L. (2000). Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 85, 2057-2067.
- Pescador, N., Houde, A., Stocco, D.M., Murphy, B.D. (1997). Follicle-stimulating hormone and intracellular second messengers regulate steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in luteinized porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 57, 660-668.
- Picard, J.Y., Goulut, C., Bourrillon, R., Josso, N. (1986). Biochemical analysis of bovine testicular anti-Müllerian hormone. *FEBS* 195, 3253-3256.
- Pickford, G.E., Atz, J.W. (1957). The physiology of the pituitary gland of fishes (New York: New York Zoological Society).
- Pierce, J.G., Parsons, T.T. (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann Rev Biochem* 50, 495.
- Piferrer, F. (2009). Determinación y diferenciación sexual en los peces. En La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura (Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura), pp. 247-336.

- Pinto, P.I.S., Teodosio, H.R., Galay-Borgos, M., Power, D.M., Sweeney, G.E. (2006). Identification of estrogen-responsive genes in the testis of sea bream (*Sparus auratus*) using suppression subtractive hybridization. *Mol Reprod Dev* 73, 318-329.
- Planas, J., Goetz, F., Swanson, P. (1997). Stimulation of brook trout ovarian steroidogenesis by gonadotropins I and II is mediated by the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate/protein kinase A pathway'. *Biol Reprod* 57, 647-654.
- Planas, J.V., Swanson, P. (1995). Maturation-associated changes in the response of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins (GTH I and GTH II) *in vitro*. *Biol Reprod* 52, 697-704.
- Poderoso, C., Converso, D.P., Maloberti, P., Duarte, A., Neuman, I., Galli, S., Maciel, F.C., Paz, C., Carreras, M.a.C., Poderoso, J.J., et al. (2008). A mitochondrial kinase complex is essential to mediate an ERK1/2-dependent phosphorylation of a key regulatory protein in steroid biosynthesis. *PLoS ONE* 3, 1-11.
- Poderoso, C., Maloberti, P., Duarte, A., Neuman, I., Paz, C., Maciel, F.C., Podesta, E.J. (2009). Hormonal activation of a kinase cascade localized at the mitochondria is required for StAR protein activity. *Mol Cel Endocrinol* 300, 37-42.
- Poonlaphdecha S, Pepey E, Huang SH, Canonne M, Soler L, Mortaji S, Morand S, Pfennig F, Melard C, Baroiller JF, et al. (2011). Elevated amh gene expression in the brain of male tilapia (*Oreochromis niloticus*) during testis differentiation. *Sex Dev* 5, 33-47.
- Popa, G., Fielding, U. (1930). A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region. *J Anat* 65, 88-92.
- Prat, F., Sumpter, J.P., Tyler, C.R. (1996). Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* 54, 1375-1382.
- Pudney, J. (1995). Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc Res Tech* 32, 459-467.
- Racine, C., Rey, R., Forest, M.G., Ferr., A., Huhtaniemi, I., Josso, N., di Clemente, N. (1998). Receptors for anti-müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *PNAS* 95, 594-599.
- Rainis, S., Mylonas, C., Kyriakou, Y., Divanach, P. (2003). Enhancement of spermiation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) at the end of the reproductive season using GnRHa implants. *Aquaculture* 219, 873-890.
- Rambabu, K., Narayana Rao, S., Rao, N. (2005). Efficient expression of transgenes in adult zebrafish by electroporation. *BMC Biotech*, 29.
- Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G.p., Wilson, J.M., Batshaw, M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* 80, 148-158.

Ratanamart, J., Shaw, J. (2006). Plasmid-mediated muscle-targeted gene therapy for circulating therapeutic protein replacement: A tale of the tortoise and the hare? *Curr Gene Ther* 6, 93-110.

Rizzuto, G., Cappelletti, M., Mennuni, C., Wiznerowicz, M., Demartis, A., Maione, D., Ciliberto, G., Monica, N.L., Fattori, E. (2000). Gene electrotransfer results in a high-level transduction of rat skeletal muscle and corrects anemia of renal failure. *Hum Gene Ther* 11, 1891-1900.

Rocha, A., Gomez, A., Zanyu, S., Cerda-Reverte, J.M., Carrillo, M. (2007). Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity. *Mol Cell Endocrinol* 272, 63-76.

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

Rodriguez, L., Begtashi, I., Zanyu, S., Carrillo, M. (2005). Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.): hormonal aspects. *Gen Comp Endocrinol* 140, 116-125.

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

Rodriguez-Mari, A., Yan, Y.L., BreMiller, R.A., Wilson, C., Cañestro, C., Postlethwait, J.H. (2005). Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Müllerian hormone (amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development. *Gene Expr Patterns* 5, 655-667.

Ruwanpura, S.M., McCauley, L., Stanton, P.G., Meachem, S.J. (2007). Follicle-stimulating hormone affects spermatogonial survival by regulating the intrinsic apoptotic pathway in adult rats. *Biol Reprod* 74, 705-708.

Ruwanpura, S.M., McLachlan, R.I., Matthiesson, K.L., Meachem, S.J. (2008a). Gonadotrophins regulate germ cell survival, not proliferation, in normal adult men. *Hum Reprod* 23, 403-411.

Ruwanpura, S.M., McLachlan, R.I., Stanton, P.G., Loveland, K.L., Meachem, S.J. (2008b). Pathways involved in testicular germ cell apoptosis in immature rats after FSH suppression. *J Endocrinol* 197, 35-43.

Sabo-Attwood, T., Kroll, K.J., Denslow, N.D. (2004). Differential expression of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) estrogen receptor isotypes alpha, beta, and gamma by estradiol. *Mol Cel Endocrinol* 218, 107-118.

Salvador, L.M., Park, Y., Cottom, J., Maizels, E.T., Jones, J.C.R., Schillace, R.V., Carr, D.W., Cheung, P., Allis, C.D., Jameson, J.L., et al. (2001). Follicle-stimulating hormone stimulates protein kinase A-mediated histone H3 phosphorylation and acetylation leading to select gene activation in ovarian granulosa cells. *J Biol Chem* 276, 40146-40155.

Sambroni, E., Le Gac, F., Breton, B., Lareyre, J.J. (2007). Functional specificity of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gonadotropin receptors as assayed in a mammalian cell line. *J Endocrinol* 195, 213-228.

- Sambroni, E., Rolland, A.D., Lareyre, J.J., Le Gac, F. (2013). Fsh and Lh have common and distinct effects on gene expression in rainbow trout testis. *J Mol Endocrinol* 50, 1-18.
- Schatz, S., Kerschbaumer, R., Gerstenbauer, G., Kral, M., Dorner, F., Cheiflinger, F. (2003). Higher expression of Fab antibody fragments in a CHO cell line at reduced temperature. *Biotechnol Bioeng* 84, 433-438.
- Schiavone, R., Zilli, L., Vilella, S., Fauvel, C. (2006). Human chorionic gonadotropin induces spermatogenesis and spermiation in 1-year-old European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Assessment of sperm quality. *Aquaculture* 255, 522-531.
- Schmidt-Wolf, G.D., Schmidt-Wolf, I.G.H. (2003). Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. *Trends Mol Med* 9, 67-72.
- Schmitz, M., Aroua, S., Vidal, B., Le Belle, N., Elie, P., 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.
- Schulz RW, van Dijk W, Chaves-Pozo E, Garcia-Lopez A, de Franca LR, J., B. (2012). Sertoli cell proliferation in the adult testis is induced by unilateral gonadectomy in African catfish. *Gen Comp Endocrinol* 177, 160–167.
- Schulz, R.W., Corput, L., Janssen-Dommerholt, J., Goos, H.J.T. (1994). Sexual steroids during puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*): serum levels and gonadotropin-stimulated testicular secretion *in vitro*. *J Comp Physiol B* 164, 195-205.
- Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *Gen Com Endocrinol* 165, 390-411.
- Schulz, R.W., Menting, S., Bogerd, J., Franca, L., Vilela, D., Godinho, H. (2005). Sertoli cell proliferation in the adult testis-evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol Reprod* 73, 891-898.
- Schulz, R.W., Miura, T. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol Biochem* 26 43-56.
- Schulz, R.W., van Dijk, W., Bogerd, J. (2003). Sertoli cell proliferation and FSH signalling in African catfish, *Clarias gariepinus*. *Fish Physiol Biochem* 28, 223-224.
- Sealfon, S.C., Weinstein, H., Millar, R.P. (1997). Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev* 18, 180-225.
- Seeger, R., Rosenberg, R., Merzi, W.E., F. Strauss, I., Jerome, Amsterdam, A. (2001). The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis. *J Biol Chem* 276, 13967-13964.
- Segev, D.L., Ha, T.U., Tran, T.T., Kenneally, M., Harkin, P., Jung, M., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K., Maheswaran, S. (2000). Müllerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkB-mediated pathway. *J Biol Chem* 275, 28371-28379.

- Servili, A., Le Page, Y., Leprince, J., Caraty, A., Escobar S, et al. (2011). Organization of two independent kisspeptin systems derived from evolutionary-ancient kiss genes in the brain of zebrafish. *Endocrinology* 152, 1527-1540.
- Sethuraman, N., Stadheim, T.A. (2006). Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotech* 17, 341-346.
- Sharpe, R.M., McKinnell, C., Kivlin, C., Fisher, J.S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 125, 769-784.
- Shaw, J., Delday, M., Hart, A., Docherty, H., Maltin, C., Docherty, K. (2002). Secretion of bioactive human insulin following plasmid-mediated gene transfer to non-neuroendocrine cell lines, primary cultures and rat skeletal muscle *in vivo*. *J Endocrinol* 172, 653-672.
- Shibata, N., Hamaguchi, S. (1988). Evidence for the sexual bipotentiality of spermatogonia in the fish, *Oryzias latipes*. *J Exp Zool* 245, 71-77.
- Shimada, M., Hernandez-Gonzalez, I., Gonzalez-Robayna, I., Richards, J.S. (2006). Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol Endo* 20, 1352-1365.
- Shimasaki, S., Moor, R.K., Otsuka, F., Erickson, G.F. (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 25, 72-101.
- Shozu, M., Sumitani, H., Murakami, K., Segawa, T., Yang, H.J., Inoue, M. (2001). Regulation of aromatase activity in bone-derived cells: possible role of mitogen-activated protein kinase. *J Steroid Biochem* 79, 61-65.
- Sikes, M.L., O'Malley, B.W., Finegold, M.J., Ledley, F.D. (1994). *In vivo* gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection. *Hum Gene Ther* 5, 837-844.
- Singh, J., Handelsman, D.J. (1996). The effects of recombinant FSH on testosterone-induced spermatogenesis in gonadotrophin-deficient (hpg) mice. *J Androl* 17, 382-393.
- Singh, J., O'Neill, C., Handelsman, D.J. (1995). Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology* 136, 5311-5321.
- Skaar, K.S., Nóbrega, R.H., Magaraki, A., Olsen, L.C., Schulz, R.W., Male, R. (2011). Proteolytically activated, recombinant anti-Müllerian hormone inhibits androgen secretion, proliferation, and differentiation of spermatogonia in adult zebrafish testis organ cultures. *Endocrinology* 152, 1-14.
- Söder, O., Bang, P., Wahab, A., Parvinen, M. (1992). Insulin-like growth factors selectively stimulate spermatogonial, but not meiotic, deoxyribonucleic acid synthesis during rat spermatogenesis. *Endocrinology* 131, 2344-2350.
- So, W., Kwok, H., Ge, W. (2005). Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits their spatial temporal expression patterns and receptor specificity. *Biol Reprod* 72, 1382-1396.

- Sohn, Y.C., Yoshiura, Y., Kobayashi, M., Aida, K. (1999). Seasonal changes in mRNA levels of gonadotropin and thyrotropin subunits in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 113, 436-444.
- Sorbera, L.A., Asturiano, J.F., Carrillo, M., Cerda, J., Kime, D.E., Zanyu, S. (1999). *In vitro* oocyte maturation in the sea bass: effects of hCG pituitary extract and steroids. *J Fish Biol* 55, 9-25.
- Sorbera, L.A., Mylonas, C., Zanyu, S., Carrillo, M., Zohar, J. (1996). Sustained administration of GnRHa increases milt volume without altering sperm counts in the Sea bass. *J Exp Zool* 276, 361-368.
- Soverchia, L., Ruggeri, B., Palermo, F., Mosconi, G., Cardinaletti, G., Scortichini, G., Gatti, G., Polzonetti-Magni, A.M. (2005). Modulation of vitellogenin synthesis through estrogen receptor beta-1 in goldfish (*Carassius auratus*) juveniles exposed to 17-[beta] estradiol and nonylphenol. *Toxicol Appl Pharm* 209, 236-243.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., Tshie, K. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98-104.
- Sriraman, V., Sairam, M.R., Rao, A.J. (2003). Evaluation of relative role of LH and FSH in regulation of differentiation of Leydig cells using EDS treated adult rat model. *J Endocrinol* 176, 151-161.
- Staton, C.A., Brown, N.J., Lewis, C.E. (2003). The role of fibrinogen and related fragments in tumour angiogenesis and metastasis. *Expert Opin Biol Ther* 3, 1105-1120.
- Stocco, D.M. (2000). The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol* 164, 247-253.
- Stocco, D.M., Wang, X., Jo, Y., Manna, P.R. (2005). Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol* 19, 2647-2659.
- Stork, P.J., Schmitt, J.M. (2002). Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol* 12, 258-266.
- Suwa, K., Yamashita, M. (2007). Regulatory mechanisms of oocyte maturation and ovulation. In *The Fish Oocyte: from basic studies to biotechnological applications*, J.C. P. Babin, E. Lubzens, ed. (Netherlands), pp. 323-347.
- Suzuki, K., Kawauchi, H., Nagahama, Y. (1988). Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen Comp Endocrinol* 71, 292-301.
- Swanson, P. (1991). Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. Paper presented at: Fish Symposium (Sheffield).
- Swanson, P., Dickey, J.T., Campbell, B. (2003). Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol Biochem* 28, 53-59.
- Tajima, K., Dantes, A., Yao, Z., Sorokina, K., Kotsuji, F., Seger, R., Amsterdam, A. (2003). Down-regulation of steroidogenic response to gonadotropins in human and rat preovulatory

granulosa cells involves mitogen-activated protein kinase activation and modulation of DAX-1 and steroidogenic factor-1. *J Clin Endocr Metab* 88, 2288-2299.

Takeo, J., Yamashita, S. (2001). Immunohistochemical localization of rainbow trout androgen receptors in the testis. *Fisheries Sci* 67, 518-523.

Tan, J., Chan, W. (1997). Efficient gene transfer into zebrafish skeletal muscle by intramuscular injection of plasmid DNA. *Mol Mar Biol Biotech* 6, 98-109.

Tanaka, M., Nakajin, S., Kobayashi, D., Fukada, S., Guan, G., Todo, T., Senthilkumaran, B., Nagahama, Y. (2002). Teleost ovarian carbonyl reductase-like 20 β -hydroxysteroid dehydrogenase: potential role in the production of maturation-inducing hormone during final oocyte maturation. *Biol Reprod* 66, 1498-1504.

Tawk, M., Tull, D., Torrente, Y., Vriz, S., Paulin, D. (2002). High-efficiency gene transfer into adult fish: A new tool to study fin regeneration. *Genesis* 32, 27-31.

Taylor, J.S., Braasch, I., Frickey, T., Meyer, A., Van de Peer, Y. (2003). Genome duplication, a trait shared by 22,000 Species of ray-finned fish. *Genome Res* 13, 382-390.

Teixeira, J., Fynn-Thompson, E., Payne, A.H., Donahoe, P.K. (1999). Müllerian-inhibiting substance regulates androgen synthesis at the transcriptional level. *Endocrinology* 140, 4732-4738.

Tena-Sempere, M. (2006). GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Hum Reprod Update* 12, 631-639.

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

Terada, Y., Tanaka, H., Okado, T., Inoshita, S., Kuwahara, M., Akiba, T., Sasaki, S., Marumo, F. (2001). Efficient and ligand-dependent regulated erythropoietin production by naked DNA injection and *in vivo* electroporation. *Am J Kidney Dis* 38, S50-S53.

Thomas, P. (1994). Hormonal control of final oocyte maturation in sciaenid fishes. In *Perspectives in Comparative Endocrinology*, K.G. Davey, Peter, R.E., Tobe, S.E., ed. (Ottawa: National Research Council of Canada), pp. 619-625.

Thomas, P., Breckenridge-Miller, D., Detweiler, C. (1997). Binding characteristics and regulation of the 17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20-S) receptor on testicular and sperm plasma membranes of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Fish Physiol Biochem* 17, 109-116.

Tong, S.K., Chung, B. (2003). Analysis of zebrafish cyp19 promoters. *J Steroid Biochem* 86, 381-386.

Tonheim, T.C., Bøgwald, J., Dalmo, R.A. (2008). What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish Shellfish Immun* 25, 1-18.

Tripathy, S.K., Svensson, E.C., Black, B.H., Goldwasser, E., Margalith, M., Hobart, P.M., Leiden, J.M. (1996). Long term expression of erythropoietin in the systemic circulation of mice after intramuscular injection of a plasmid DNA vector. *Proc Natl Acad Sci* 93, 10876-10880.

- Trollet, C., Scherman, D., Bigey, P. (2008). Delivery of DNA into mouse for treating systemic diseases: Advantages and challenges. In *Electroporation protocols Preclinical and clinical gene medicine*, S. Li, ed. (Totowa, New Jersey: Humana Press), pp. 199-214.
- Trudeau, V.L. (1997). Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev Reprod* 2, 55-68.
- Tse, A., Ge, W. (2010). Spatial localization of EGF family ligands and receptors in the zebrafish ovarian follicle and their expression profiles during folliculogenesis. *Gen Comp Endocrinol* 167, 397-407.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P., Kawauchi, H., Swanson, P. (1991). Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 84, 291-299.
- Ulloa-Aguirre, A., Zariñán, T., Pasapera, A.M., Casas-González, P., Días, J.A. (2007). Multiple facets of follicle-stimulating hormone receptor function. *Endocrinology* 32, 251-263.
- Van der Kraak, G. (1990). The influence of calcium ionophore and activators of protein kinase C on steroid production by preovulatory ovarian follicles of the goldfish. *Biol Reprod* 42, 231-238.
- Van der Kraak, G. (1992). Mechanisms by which calcium ionophore and phorbol ester modulate steroid production by goldfish preovulatory ovarian follicles. *J Exp Zool* 262, 271-278.
- Van Oordt, P.G.W., Peute, J. (1983). The cellular origin of the pituitary gonadotropins in teleosts. In *Fish Physiology*, D.J.R.y.E.M.D. W.S. Hoar, ed. (New York: Academic Press), pp. 137-186
- Verhoeven, G., Cailleau, J. (1986). Stimulatory effects of epidermal growth factor on steroidogenesis in Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 47, 99-106.
- Verri, T., Ingrosso, L., Chiloiro, R., Danieli, A., Zonno, V., Alifano, P., Romano, N., Scapigliati, G., Vilella, S., Storelli, C. (2003). Assessment of DNA vaccine potential for gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by intramuscular injection of a reporter gene. *Fish Shellfish Immun* 15, 283-295.
- Vicat, J., Boisseau, S., Jourdes, P. (2000). Muscle transfection by electroporation with high-voltage and short-pulse currents provides high-level and long-lasting gene expression. *Hum Gene Ther* 11, 909-916.
- Vilela, D.A.R., Silva, S.G.B., Peixoto, M.T.D., Godinho, H.P., França, L.R. (2003). Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiol Biochem* 28, 187-190.
- Vilquin, J.T., Kennel, P.F., Paturneau-Jouas, M., Chapdelaine, P., Biossel, N., Delaere, P., Tremblay, J.P., Scherman, D., Fisman, M.Y., Schwartz, K. (2001). Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther* 8, 1097-1107.
- Vischer, H.F., Granneman, J.C.M., Linskens, M.H.K., Schulz, R.W., Bogerd, J. (2003). Both recombinant African catfish LH and FSH are able to activate the African catfish FSH receptor. *J Mol Endocrinol* 31, 133-140.
- Viswanathan, P., Wood, M.A., Walker, W.H. (2009). Follicle-stimulating hormone (FSH) transiently blocks FSH receptor transcription by increasing inhibitor of deoxyribonucleic acid

binding/differentiation-2 and decreasing upstream stimulatory factor expression in rat Sertoli cells. *Endocrinology* 150, 3783-3791.

Volckaert, F.A.M., Batargias, C., Canario, A., Chatziplis, D., Chistiakov, D., Haley, C., Libertini, A., Tsigenopoulos, C., Kocher, T., Kole, C. (2008). European Sea Bass. In *Genome Mapping and Genomics in Fishes and Aquatic Animals* (Springer Berlin Heidelberg), pp. 117-133.

Vornberger, W., Prins, G., Musto, N.A., Suarez-Quian, C.A. (1994). Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134, 2307-2316.

Wahab-Wahlgren, A., Martinelle, N., Holst, M., Jahnukainen, K., Parvinen, M., Söder, O. (2003). EGF stimulates rat spermatogonial DNA synthesis in seminiferous tubule segments *in vitro*. *Mol Cell Endocrinol* 201, 39-47.

Wahlström, T., Huhtaniemi, I., Hovatta, O., Seppälä. (2010). Localization of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, prolactin, and their receptors in human and rat testis using immunohistochemistry and radioreceptor assay. *J Clin Endocrinol Metab* 57, 825-830.

Wallace, R.A., Selman, K. (1990). Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J Electron Microscop* 16, 175-201.

Wang, D.S., Jiao, B., Hu, C., Huang, X., Liu, Z., Cheng, C.H. (2008b). Discovery of a gonad-specific IGF subtype in teleost. *Biochem Biophys Res Commun* 367, 336-341.

Wang, G.M., O'Shaughnessy, P.J., Chubb, C., Robaire, B., Hardy, M.P. (2003). Effects of insulin-like growth factor I on steroidogenic enzyme expression levels in mouse leydig cells. *Endocrinology* 144, 5058-5064.

Wang, Y., Ge, W. (2002). Cloning of zebrafish ovarian carbonyl reductase-like 20[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase and characterization of its spatial and temporal expression. *Gen Comp Endocrinol* 127, 209-216.

Wang, Y., Ge, W. (2004). Cloning of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor from the zebrafish ovary: evidence for EGF as a potential paracrine factor from the oocyte to regulate activin/follistatin system in the follicle cells. *Biol Reprod* 71, 749-760.

Welsh, T.H., Jones, P.B.C., Hsueh, A.J.W. (1984). Phorbol ester inhibition of ovarian and testicular steroidogenesis *in vitro*. *Cancer Res* 44, 885-892.

Weltzein, F., Andersson, E., Andersen, O., Shalchian, K., Norberg, B. (2004). The brain-pituitary-gonadal axis in male teleost, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comp Biochem Physiol* 137, 447-477.

Wolf, D.A., Herzinger, T., Hermeking, H., Blaschke, D., Hörz, W. (1993). Transcriptional and posttranscriptional regulation of human androgen receptor expression by androgen. *Mol Endocrinol* 7, 924-936.

Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247, 1465-1468.

- Wong, R.W.C., Kwan, R.W.P., Mak, P.H.S., Mak, K.K.L., Sham, M., Chan, S. (2000). Overexpression of epidermal growth factor induced hypospermatogenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 275, 18297-18311.
- Wu, J., Dent, P., Jelinek, T., Wolfman, A., Weber, M.J., Sturgill, T.W. (1993). Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 262, 1065-1069.
- Xie, Q.F., Wu, C.X., Meng, Q.Y., Li, N. (2004). Ghrelin and truncated ghrelin variant plasmid vectors administration into skeletal muscle augments long-term growth in rats. *Domest Anim Endocrin* 27, 155-164.
- Yan, L., Swanson, P., Dickhoff, W.W. (1992). A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). *Biol Reprod* 47, 418-427.
- Yano, A., Suzuki, K., Yoshizaki, G. (2008). Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout vasa regulatory regions. *Biol Reprod* 78, 151-158.
- Yaron, Z., Gur, G., Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., Levavin-Sivan, B. (2003). Regulation of fish gonadotropins. *Int Rev Cytol* 225, 131-185.
- Yasui, A., Oda, K., Usunomiya, H., Kakudo, K., Suzuki, T., Yoshida, T., Park, H.M., Fukazawa, K., Muramatsu, T. (2001). Elevated gastrin secretion by *in vivo* gene electroporation in skeletal muscle. *Int J Mol Med* 8, 489-494.
- Yazawa, T., Yamamoto, T., Jin, Y., Abé, S.I. (2002). Follicle-stimulating hormone is indispensable for the last spermatogonial mitosis preceding meiosis initiation in newts (*Cynops pyrrhogaster*). *Biol Reprod* 66, 14-20.
- Yazawa, T., Yamamoto, T., Nakayama, Y., Hamada, S., Abé, S. (2000). Conversion from mitosis to meiosis: Morphology and expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Dmc1 during newt spermatogenesis. *Develop Growth Differ* 42, 603-611.
- Yilmaz, Ozlem. 2006. Efecto de la luz continua y de los androgenos sobre el desarrollo testicular de la lubina (*Dicentrarchus labrax L.*). Tesis de Master Internacional en Acuicultura. Universidad de las Palmas de GC-Instituto Canario de Ciencias Marinas
- Yoo, J., Soker, S., Lin, L.F., Mehegan, K., Guthrie, P.D., Atala, A. (1999). Direct *in vivo* gene transfer to urological organs. *J Urology* 162, 115-118.
- Yoshinaga, N., Shiraishi, E., Yamamoto, T., Iguchi, T., Abe, S., Kitani, T. (2004). Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Müllerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem Bioph Res Co* 322, 508-513.
- Young, M., Mcphaul, M.J. (1998). A steroidogenic factor-1-binding site and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like elements are required for the activity of the rat aromatase promoter in rat Leydig tumor cell lines. *Endocrinology* 139, 5083-5093.
- Yukinori, K., Mayuko, K., M, T., Chiemi, M., Sonoko, Y., John M., T., Shinji, A., Kohei, Y. (2008a). Japanese eel follicle-stimulating hormone (Fsh) and luteinizing hormone (Lh): Production

of biologically active recombinant Fsh and Lh by *Drosophila* S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. *Biol Reprod* 79, 938-946.

Zanuy, S., and Carrillo, M. (1987). La reproducción de los teleosteos y su aplicación en acuicultura. In *Reproducción en acuicultura*, J.E.d.l.M.y.U. Labarta, ed. (Madrid: CAICYT), pp. 1-131.

Zanuy, S., Carrillo, M., Mateos, J., Trudeau, V., Kah, O. (1999). Effects of sustained administration of testosterone in pre-pubertal sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). *Aquaculture* 177, 15.

Zanuy, S., Carrillo, M., Rocha, A., Molés, G. (2009). Regulación y control hormonal del proceso reproductor en teleósteos. En: *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura* (Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura), pp. 97-154.

Zelevnik, J., Saxena, D., Little, I. (2003). Protein kinase B Is obligatory for follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology* 144, 3985-3994.

Zhang, P., Mellon, S.H. (1996). The orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1 regulates the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-mediated transcriptional activation of rat cytochrome P450c17 (17 alpha-hydroxylase/c17-20 lyase). *Mol Endocrinol* 10, 147-158.

Zhou, L.Y., Wang, D.S., Kobayashi, T., Yano, A., Paul-Prasanth, B., Suzuki, A., Sakai, F., Nagahama, Y. (2007a). A novel type of P450c17 lacking the lyase activity is responsible for C21-steroid biosynthesis in the fish ovary and head kidney. *Endocrinology* 148, 4282-4291.

Zhou, L.Y., Wang, D.S., Shibata, Y., Paul-Prasanth, B., Suzuki, A., Nagahama, Y. (2007b). Characterization, expression and transcriptional regulation of P450c17-I and -II in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Bioph Res Comm* 362, 619-625.

Zmora, N., González-Martínez D, Muñoz-Cueto JA, Madigou T, Mañanos-Sanchez E, Zanuy, S., Zohar Y, Kah O, A, E. (2002). The GnRH system in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Endocrinol* 172, 105-116.

Zmora, N., Kazeto, Y., Kumar, R.S., Schulz, R., W., Trant, J., M. (2007). Production of recombinant channel catfish (*Ictalurus punctatus*) FSH and LH in S2 *Drosophila* cell line and an indication of their different actions. *J Endocrinol* 194, 407-416.

Zohar, J., Mylonas, C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fishes: from hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99-136.

Zohar, Y., Muñoz-Cueto, J.A., Elizur, A., Kah, O. (2010). Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 165, 438-45

ANEXO I

Listado de publicaciones

Mazón, M.J., Carrillo, M. Zanuy, S. Gómez, A. 2013. Luteinizing Hormone Plasmid Therapy Results in Long-Lasting High Circulating Lh and Increased Sperm Production in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Biology of Reproduction** **88(2): 32 2013**

Mazón, M.J., Gómez, A., Yilmaz, O., Carrillo, M., Zanuy, S. 2014. Administration of FSH *in vivo* Triggers Testicular Recrudescence of Juvenile European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). **Biology of Reproduction** **90 (1): 6 1-10**

Mazón, M.J., Zanuy, S., Gómez, A. Fsh, but not Lh, turns on testicular recrudescence in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) promoting germ cell differentiation and proliferation. **Manuscrito en preparacion**

Mazón, M.J., Nóbrega, R., Schulz, R.W., Zanuy, S., Gómez, A. Involvement of cAMP/PKA and MAP kinases pathways on steroid synthesis stimulated by FSH in two teleost fish, *Dicentrarchus labrax* and *Danio rerio*. **Manuscrito en preparacion**

Chauvigné, F., Verdura, S., **Mazón, MJ.**, Duncan, N., Zanuy, S., Gómez, A., Cerdá, J. 2012. Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone mediate the androgenic pathway in leydig cells of an evolutionary advanced teleost. **Biology of Reproduction**, **87 (2):35, 1-12.**

Muñoz I, Zanuy, S., **Mazón, MJ.**, Carrillo, M., Gómez, A. 2013. Somatic gene transfer in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Optimal fish conditions and exogenous control of foreign genes. **Aquaculture**. **388-391, 60-69**

Crespo, B., Gómez, A., **Mazón, M.J.**, Carrillo, M., Zanuy, S. 2013. Gdsf1, Ff1b and Star are early gonadal markers of precocious puberty in male European sea bass. **General and Comparative Endocrinology**, **191: 155-167**

ANEXO II

Participaciones en Congresos

Gómez, A., **Mazón, M.J.**, Molés, G., Rocha, A., Crespo, B., Lan-Chow-Wing, O., Muñoz, I., Espigares, F., Felip, A., Carrillo, M. and Zanuy, S. *Gonadotropins action in sea bass: endocrine roles and biotechnological application*. 10th ISRPF. Faro, Mayo-2014.

Muñoz, I., Rocha, A., **Mazón, M.J.**, Zanuy, S., Gómez, A. *The Epidermal Growth Factor family in the ovary of European sea bass (Dicentrarchus labrax)*. ICCE. Barcelona (Spain), July-2013.

Mazón, M.J., Gómez, A., Zanuy, S. *Fsh, but not Lh, turns on testicular recrudescence in sea bass (Dicentrarchus labrax) promoting germ cell differentiation and proliferation*. 7th ISFE. Argentina, September-2012

Crespo, B., Gómez, A., **Mazón, M.J.**, Carrillo, M., Zanuy, S. *Early markers of precocious puberty in European sea bass (Dicentrarchus labrax) testis*. 7th ISFE. Argentina, September-2012

Mazón, M.J., Gómez, A., Zanuy, S. *Follicle stimulating hormone function in sea bass spermatogenesis*. X National Aquaculture Conference. Castelldefels (Spain), November-2011

Mazón, M.J., Zanuy, S., Carrillo, M., Gómez, A. *Use of somatic gene transfer for studying gonadotropin actions in sea bass (Dicentrarchus labrax)*. 9th ISRPF. Kochi (India), August-2011

Mazón, M.J., Gómez, A., Zanuy, S. *Follicle stimulating hormone activates the steroidogenic process via cAMP/PKA and MAP-kinase pathways in the ovary of sea bass (Dicentrarchus labrax)*. 9th ISRPF. Kochi (India), August-2011

Verdura, S., Chauvigné, F., **Mazón, M.J.**, Zanuy, S., Gómez, A., Cerdà, J. *Production of Senegalese sole recombinant gonadotropins for the control of reproduction: New insights into the endocrine control of spermatogenesis*. Workshop: The cultivation of Soles V. Faro (Portugal), February-2011.

Mazón, M.J., Gómez, A., Zanuy, S. *Changes on reproductive function in sea bass (Dicentrarchus labrax) following intramuscular injection of an FSH single-chain-expression plasmid*. 25th Conference of European Comparative Endocrinologists, Pécs (Hungary), September-2010.

Mazón, M.J., Zanuy, S., Gómez, A. *Involvement of PKA and MAP kinases routes on steroid synthesis stimulated by FSH in sea bass (Dicentrarchus labrax)*. 25th Conference of European Comparative Endocrinologists, Pécs (Hungary), September-2010. (Poster)

Gómez, A., Molés, G., **Mazón, M.J.**, Rocha, A., Crespo, B., Carrillo, M., and Zanuy, Z. *European Sea Bass Dicentrarchus labrax gonadotropins: Endocrine roles and biotechnological applications*. Aquaculture 2010, World Aquaculture Society, San Diego (USA), March- 2010.

Mazón, M.J., Gómez, A., Zanuy, S. *Changes on reproductive stage of immature European sea bass (Dicentrarchus labrax) males following intramuscular injection of recombinant single-chain FSH.* VII Conference Iberian Society of Comparative Endocrinology. Oporto (Portugal), September-2009.

S. Zanuy, M. Carrillo, A. Felip, B. Crespo, A. Gómez and **M.J. Mazón**. *Advances in the control of puberty and reproductive cycle in European sea bass, Dicentrarchus labrax.* Aquaculture Europe. Krakovia, September-2009

M Carrillo, S Zanuy, A Felip, MJ Bayarri, G Molés, **MJ Mazón**, A Gómez. *Hormonal and environmental control of puberty in perciform fish: the case of sea bass.* 24th Conference European Comparative Endocrinologist. Genova (Italy), September- 2008.

M.J. Mazón, M. Carrillo, A. Gómez, S. Zanuy. *In vivo effects of LHsc on spermiogenesis and LH plasma levels on sea bass (Dicentrarchus labrax).* VI Conference Iberian Society of Comparative Endocrinology. Cádiz (Spain), Septiembre-2007.