
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENT DE BIOLOGIA FUNCIONAL Y
ANTROPOLOGIA FÍSICA

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE ACUICULTURA DE TORRE DE LA SAL

Caracterización Bioquímica, Molecular y Funcional de las
Hormonas Gonadotropas en la Lubina (*Dicentrarchus labrax*)

Memoria presentada por
Jorge Mateos Pérez
para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
BIBLIOTECA CIÈNCIES
Nº Registre23.624.....
DATA04-05-05.....
SIGNATURA Biblioteca
TD. B/776
Nº LIBIS: C.18223463

24cm

Valencia, 2004

UMI Number: U607707

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607707

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346



Consejo Superior de Investigaciones Científicas

INSTITUTO DE ACUICULTURA DE TORRE DE LA SAL

Torre la Sal s/n, Ribera de Cabanes

Tel. 34-96 431 95 00

Fax. 34-96 431 95 09

12595 Castellón, España

MANUEL CARRILLO ESTÉVEZ, Profesor de Investigación, y EVARISTO MAÑANÓS SÁNCHEZ, Científico Titular, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral titulada **Caracterización bioquímica, molecular y funcional de las hormonas gonadotropas en la Lubina (*Dicentrarchus labrax*)** ha sido realizada por el Licenciado en Ciencias Biológicas **Don Jorge Mateos Pérez** bajo su dirección y en el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Valencia, a 12 de Enero de 2004

Fdo: Dr. Manuel Carrillo

Fdo: Dr. Evaristo Mañanós

Dedicada a mis padres,

Pascual y Sacra

y a mis amigas,

Victoria y Lucía

AGRADECIMIENTOS

Estoy muy agradecido a todas las personas que a lo largo de mi vida se han preocupado por mi educación, profesores, compañeros y directores. Pero especialmente a mis padres, sin su apoyo y sus enseñanzas para enfrentarme a los retos de cada día no hubiera sido posible alcanzar el final de este trabajo.

No quiero dejar de mencionar a los miembros de la Universidad de Valencia, el CSIC y otras instituciones nacionales y europeas que han hecho posible esta tesis, a muchos de ellos no los he podido conocer.

A la Dra. Silvia Zanuy Doste por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y que gracias a su confianza y empeño ha hecho posible la conclusión de esta tesis doctoral.

A mis directores, Dr. Manuel Carrillo y Dr. Evaristo Mañanós, por dirigirme y permitirme realizar esta tesis doctoral.

Al Dr. Gonzalo Martínez por su inagotable fuente de conocimientos, energía y paciencia.

A los Drs. Marina Govoroun y Bernard Breton, por acogerme en su laboratorio.

Al Dr. Bruno Quérat por su trabajo sobre las relaciones filogenéticas y evolutivas de las gonadotropinas.

A mis compañeros y amigos en el laboratorio, por los buenos momentos, por el esfuerzo, las risas y una parte de nuestra vida compartida.

No quiero dejar de citar al Dr. José Miguel Cerdá, por su disposición, buen humor y criterio y a la Dra. Ana Gómez por sus consejos.

A todo el personal del instituto de torre la sal por su labor encomiable.

A todos mis amigos y familiares, por su apoyo moral.

Finalmente quiero resaltar que este trabajo ha sido posible gracias a una beca predoctoral del antiguo Ministerio de Educación y Ciencia.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
PRESENTACIÓN	5
ARTÍCULOS INCLUIDOS EN LA TESIS	9
INTRODUCCIÓN	11
La lubina	13
Las gónadas de los teleósteos	15
El testículo de los teleósteos	16
El ovario de los teleósteos	18
La hipófisis y el hipotálamo de los teleósteos	20
Las hormonas gonadotropas	24
Estructura molecular de las GTHs	26
Organización genómica de las GTHs	29
<i>Estructura del gen de la subunidad α</i>	30
<i>Estructura del gen de la subunidad β</i>	30
Hipótesis actuales sobre el origen y la evolución de las GTHs.	31
Receptores de gonadotropinas	34
Hormonas esteroideas	36
Aromatización	40
Receptores de esteroides	41
Mecanismos de retroalimentación	42
Retroalimentación negativa	43
Retroalimentación positiva	45
Regulación hipotalámica de las gonadotropinas	48
OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	53

Índice

ARTÍCULO 1

Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (α , FSH β , and LH β) and their expression during the reproductive cycle 57

ARTÍCULO 2

Purification of luteinizing hormone (LH) in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and development of a specific immunoassay (ELISA) 99

ARTÍCULO 3

Effects of sustained administration of testosterone in pre-pubertal sea bass (*Dicentrarchus labrax* L) 123

ARTÍCULO 4

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 147

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN 177

Caracterización molecular de las gonadotropinas de la lubina 179

Clonación y análisis de las secuencias de las subunidades α , β LH y β FSH de la lubina 181

Origen y evolución de las gonadotropinas 182

Síntesis de las gonadotropinas en la lubina macho 184

Caracterización bioquímica de las gonadotropinas de la lubina 187

Purificación de la LH de la lubina 189

Desarrollo de un ELISA para la LH de la lubina 191

Efecto del GnRH α sobre la secreción de la LH en lubinas hembras maduras 192

Estudio de los mecanismos de retroalimentación de los esteroides sexuales sobre el sistema gonadotropo de la lubina 195

Efecto de la administración sostenida de testosterona en la lubina prepúbere 197

Regulación de la expresión génica de la FSH y LH de la lubina por el GnRH y los esteroides sexuales 200

CONCLUSIONES 207

BIBLIOGRAFÍA 213

ABREVIATURAS

11KT	11 ketotestosterona
17,20betaP	17 α ,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona
20betaS	17 α ,20 β ,21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona
5'-UTR	región 5' no trasladada
5-HT	serotonina
aa	aminoácido
B	unión de cada punto
Bo	unión máxima
BSA	albúmina de suero bovino
cDNA	ácido desoxiribonucleico circular
CG	hormona gonadotropina coriónica
CHG	eje cerebro-hipófisis-gónada
CV	coeficiente de variación
DA	dopamina
DHT	dihidrotestosterona
DNA	ácido desoxiribonucleico
E₂	estradiol
Eds	editores
EIA	ensayo inmunoenzimático
ELISA	ensayo enzimático inmunoabsorbente
ER	receptor de estrógenos
ERE	elemento regulador de estrógenos
FSH	hormona estimulante del folículo
GABA	ácido γ -aminobutírico
GH	hormona del crecimiento
GnRH	factor regulador de la secreción de las gonadotropinas
GRIF	factor inhibidor de las gonadotropinas

Abreviaturas

GSI	índice gónado-somático
GTH	hormona gonadotropa
HSD	diferencias significativas honestas
IEC	cromatografía de intercambio iónico
kb	kilo base
LH	hormona luteinizante
LSD	diferencias significativas menores
MIS	esteroides inductores de la maduración
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MT	metiltestosterona
NSB	unión no específica
NPY	neuropéptido Y
pb	par de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PRL	prolactina
PY	péptido pancreático Y
PYY	péptido YY
RER	retículo endoplasmático rugoso
RNA	ácido ribonucleico
rpHPLC	cromatografía líquida de alta presión en fase reversa
SEM	error estándar de la media
SL	somatolactina
T	testosterona
TFA	ácido trifluoroacético
TSH	hormona estimulante de la tiroides

INTRODUCCIÓN

GENERAL

PRESENTACIÓN

El trabajo que se presenta en esta tesis doctoral se ha desarrollado en el Departamento de Fisiología de la Reproducción de Peces del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

El campo de investigación, bajo el que se ha enmarcado esta tesis, gira alrededor del estudio general del proceso reproductor de los peces, tomando como especie principal de trabajo la lubina, *Dicentrarchus labrax* L. Dentro de este campo se trabaja en varias líneas tales como el control ambiental y hormonal de la reproducción, la formación y calidad de los gametos, la determinación sexual y la pubertad. A lo largo del tiempo el grupo de investigación ha ido adaptando las nuevas técnicas de investigación con el objeto de profundizar en sus líneas de trabajo. Desde las primeras investigaciones para adaptar la lubina a la cautividad y conseguir su reproducción, se ha estudiado la fisiología de su proceso reproductor, adoptando siempre la tecnología más moderna. En los años ochenta y noventa se desarrollaron numerosas técnicas bioquímicas para detectar metabolitos y hormonas, que han dado paso en los últimos años, sin dejar a un lado las primeras, a las técnicas de biología molecular. Actualmente, estas técnicas son de uso rutinario, y se siguen introduciendo otras nuevas, para estar en la primera línea de este campo de la ciencia.

La especie elegida para este trabajo es la lubina. Se trata de un pez muy apreciado en los mercados europeos y de una gran relevancia en la acuicultura del Mar Mediterráneo. La lubina se reproduce espontáneamente en cautividad bajo condiciones óptimas. Ahora bien, para mejorar y controlar artificialmente la capacidad reproductora se utiliza la inducción a la puesta en cautividad. Por otro lado, se pueden emplear ciclos de luz y temperatura artificiales para obtener puestas en varias estaciones del año. Las gonadotropinas u hormonas gonadotropas (GTHs) determinan estos procesos, así como la diferenciación sexual y la pubertad. Sin embargo y a pesar de su importancia para el proceso reproductor, no se disponía hasta la fecha de ningún ensayo homólogo para la determinación y cuantificación de las hormonas gonadotropas en esta especie. Esto ha

constituido una limitación grave en la comprensión de los mecanismos del control hormonal de la reproducción de la lubina. Esta carencia estaba motivada fundamentalmente por un desconocimiento de la composición molecular y bioquímica de las susodichas hormonas, no habiéndose abordado todavía la purificación de las hormonas gonadotropas ni el clonaje y caracterización de sus RNAs mensajeros, que son previos para cualquier puesta a punto de los ensayos y disponer de métodos sensibles y específicos para el estudio de los aspectos fisiológicos controlados por las GTHs.

Así pues, el tema de la tesis doctoral es la caracterización bioquímica y molecular de las gonadotropinas (GTHs) en la lubina, así como el estudio de los mecanismos de retroalimentación de los esteroides sexuales sobre las GTHs.

Esta tesis se presenta como compendio de publicaciones y comprende tres artículos publicados en revistas internacionales y uno en proceso de revisión. En el primero se procedió al clonaje de los genes que codifican las GTHs. Este trabajo dio como resultado la secuencia completa de los tres genes de las correspondientes subunidades que forman las dos GTHs. Genes que han sido descritos, analizados y caracterizados, así como realizado el estudio de sus interrelaciones filogenéticas y evolutivas. El trabajo del clonaje permitía, además, disponer de tres sondas genéticas con la que estudiar los parámetros de la expresión de las GTHs en la pituitaria. El segundo fue obtener y caracterizar la LH de la lubina, que junto a la FSH, forma el grupo de las GTHs. Este trabajo se basó en investigaciones previas en las que se había obtenido la LH de la lubina americana, especie afín a la lubina europea objeto de esta investigación. Una vez purificada la LH, se pudo desarrollar un método inmunoenzimático mediante la técnica de ELISA para cuantificar la síntesis y la secreción de la LH en la lubina. Con estas herramientas, y un trabajo previo, incluido en esta tesis en tercer lugar, en el que se había descrito el mecanismo de regulación del proceso reproductor por la testosterona en lubinas prepúberes, se realizaron varias experiencias. Cabe destacar la cuarta publicación, que trata de los efectos de los esteroides sexuales sobre la expresión de las GTHs. También se analizaron los perfiles de secreción de la LH tras la inyección de GnRH α , sustancia que se emplea para inducir la puesta de las lubinas hembra maduras (incluido en

Introducción General

la primera publicación). Y se describió el ciclo de expresión de las GTHs de la lubina macho durante la etapa de reproducción (incluido en la segunda publicación).

La investigación de la función de las GTHs es una de las bases que permiten la comprensión de la regulación hormonal del proceso reproductor. Así mismo, puede contribuir a mejorar la tecnología del control de la reproducción de los peces, en concreto de la lubina y de otras especies relacionadas estrechamente con ella e importantes económicamente. Por tanto, esta tesis pretende llenar un vacío en el conocimiento de la función de las gonadotrofinas en la lubina, primero generando las herramientas bioquímicas y moleculares de análisis y en segundo lugar aplicándolas a estudios fisiológicos mediante experimentos específicos diseñados para tal fin.



ARTÍCULOS INCLUIDOS EN LA TESIS DOCTORAL

Artículo 1

Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (α , FSH β , and LH β) and their expression during the reproductive cycle.

Jorge Mateos, Evaristo Mañanós, Gonzalo Martínez-Rodríguez, Manuel Carrillo, Bruno Quérat y Silvia Zanuy.

General and Comparative Endocrinology 2003; 133: 216–232

Artículo 2

Purification of luteinizing hormone (LH) in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and development of a specific immunoassay (ELISA).

Jorge Mateos, Evaristo Mañanós, Manuel Carrillo y Silvia Zanuy.

Scientia Marina 2004 (en revisión)

Artículo 3

Effects of sustained administration of testosterone in pre-pubertal sea bass (*Dicentrarchus labrax* L).

Silvia Zanuy, Manuel Carrillo, Jorge Mateos, Vance Trudeau y Olivier Kah

Aquaculture 1999; 177: 21-35

Artículo 4

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.

Jorge Mateos, Evaristo Mañanós, Manuel Carrillo y Silvia Zanuy.

Comparative Biochemistry and Physiology Part B 2002; 132: 75–86

INTRODUCCIÓN

La reproducción sexual constituye uno de los fenómenos más intrigantes de la biología. Continuamente se crean nuevos conjuntos de genes a los que definimos como individuos, cada uno de los cuales no existía antes dentro de cada especie. Esta continua variación de las características de las especies, la selección de los caracteres más ventajosos y su conservación, ha llevado a que éstas se adapten a los cambios de las condiciones ambientales y a que hayan sobrevivido a lo largo de millones de años.

La reproducción es un proceso fisiológico integrado, en el que intervienen todas las funciones del organismo, tales como el crecimiento, es decir el desarrollo y la diferenciación, el metabolismo energético, el comportamiento y la adaptación. Requiere el desarrollo hasta la madurez sexual, la percepción de los estímulos ambientales para la iniciación de los ciclos gonadales del macho y de la hembra sincronizando la producción de gametos, el reconocimiento de las potenciales parejas, el comportamiento del apareo, el cuidado de la prole en muchas especies y la lactancia de las hembras en los animales placentarios.

Todos estos procesos están bajo el control directo o indirecto de sistemas neuroendocrinos entre los cuales el eje encéfalo-hipófisis-gónada (eje CHG) es el más importante (Fig. 1). El encéfalo integra las señales del medio externo e interno y, a través de células neurosecretoras situadas en el área hipotalámica, controla la producción y la secreción de las GTHs en la hipófisis. Las GTHs alcanzan a través del sistema circulatorio las gónadas, donde se unen a los receptores de gonadotropinas y mediante los cuales controlan dos funciones primordiales, la producción de gametos y la síntesis y secreción de hormonas gonadales.

Las hormonas gonadales ejercen un gran número de funciones, tales como el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y el comportamiento sexual, pero también actúan mediante un sistema de regulación por retroalimentación sobre el encéfalo y la hipófisis. El mecanismo de retroalimentación más usual es el que actúa de manera negativa, es decir la actividad gonadal y sus secreciones hormonales suprimen la

secreción de GTHs directamente en la hipófisis o indirectamente a través del hipotálamo. Sin embargo, también puede actuar una retroalimentación positiva, en función de la identidad de la hormona y del estado del ciclo reproductor. Por tanto, las hormonas gonadales regulan la síntesis y la actividad secretora de los componentes neuronales e hipofisarios del eje CHG.

Las células gonadotropas de la hipófisis (también llamadas gonadotropos) juegan un papel prioritario en el eje CHG. Como se decía anteriormente, están bajo el control de las

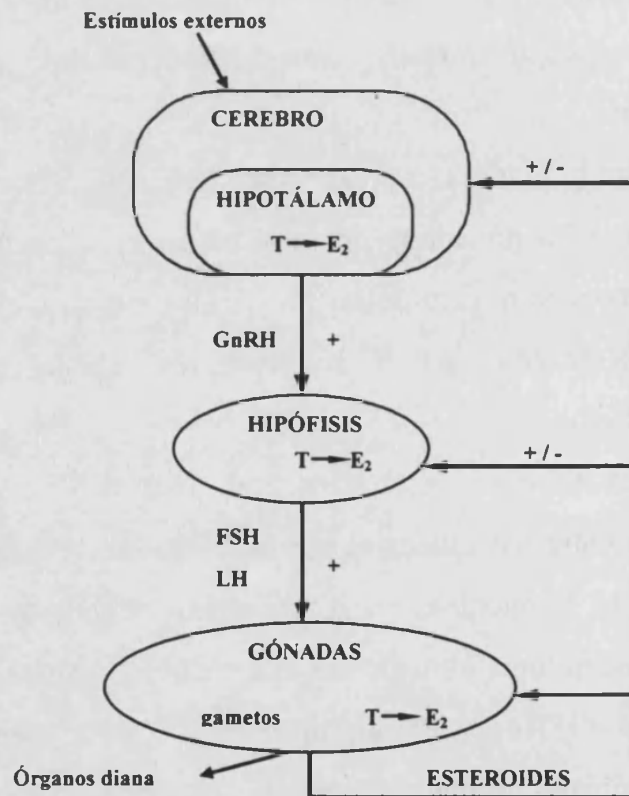


Fig. 1: El eje cerebro-hipófisis-gónada en peces.

hormonas hipotalámicas y las hormonas gonadales. Probablemente, el factor regulador de la secreción de las gonadotropinas (GnRH) sea la neurohormona más importante del eje CHG y para la cual hay receptores específicos en las células gonadotropas. Pero no es la única que regula la síntesis y secreción de las GTHs, también ejercen esta función la

dopamina, taurina, serotonina, glutamina, neuropéptido Y (NPY), ácido γ -aminobutírico (GABA) y algunas otras sustancias (Trudeau y Peter, 1995), aunque muchas de ellas lo hacen influyendo sobre el GnRH.

A pesar de que el conocimiento de la reproducción de los vertebrados se ha incrementado considerablemente en las últimas décadas, no se ha alcanzado por completo la comprensión de los factores neuroendocrinos y gonadales que controlan la reproducción. Lo que es especialmente cierto en los vertebrados no mamíferos, en concreto en los peces teleósteos. La reproducción de los teleósteos es interesante tanto funcional como comparativamente, ya que los teleósteos son el grupo más grande de los vertebrados, y porque han desarrollado soluciones diferentes a las de mamíferos para controlar la reproducción. Por ello, muchos fisiólogos y endocrinólogos de la reproducción se han visto atraídos por los teleósteos como animales de estudio y experimentación.

LA LUBINA

La lubina (*D. labrax*) es un pez que pertenece a la clase Actinopterygii, grupo Teleósteos, orden Perciformes, suborden Percoidei, familia Moronidae y género *Dicentrarchus*. Se localiza en las áreas geográficas Paleártica y Etiope, se distribuye en el Atlántico desde el norte de Inglaterra hasta el norte de África y en todo el Mediterráneo y el mar Negro (Wheeler y Alwyne, 1975).

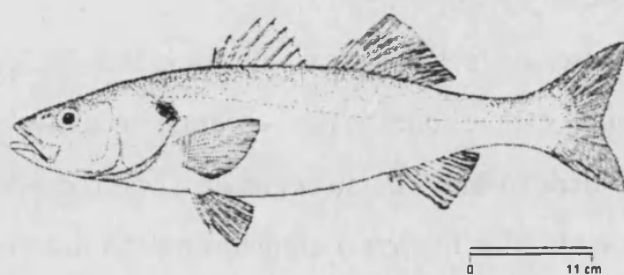
La lubina alcanza un peso máximo de unos 9 a 10 Kg. y 1 metro de longitud. El cuerpo de la lubina está cubierto por escamas grandes y regulares. El color varía considerablemente dependiendo de su lugar de origen, desde el gris oscuro, azul o verde de la parte superior al color blanco o amarillo pálido del vientre. Los flancos son azules plateados, bronceados o dorados pálidos. La cabeza de los juveniles es bastante puntiaguda, pero se vuelve más redondeada en los peces adultos. La lubina en su primer año tiende a ser más pálida que los adultos, y por lo general tiene manchas oscuras en los laterales. Normalmente estas manchas desaparecen con el tiempo, aunque algunos

ejemplares las conservan durante la vida adulta (Pickett *et al.*, 1994; Wheeler y Alwyne, 1975).

La lubina es una especie típicamente costera que frecuenta la zona de oleaje, alrededor de los afloramientos de rocas y aguas poco profundas. Se pueden encontrar en estuarios de aguas salobres, por lo que se piensa que podrían adaptarse a la vida en aguas dulces. Tienen comportamientos migratorios, acercándose a la costa en primavera y verano, y trasladándose a aguas más profundas durante el otoño. La lubina desova cerca de la costa (Wheeler y Alwyne, 1975).

La lubina es una especie depredadora que se alimenta principalmente de pescado pelágico pequeño como sardinas, espadines y eperlanes. También se alimentan de peces pequeños del fondo y de otros animales bentónicos como crustáceos y cefalópodos. Las lubinas juveniles comen más invertebrados que los adultos. Son depredadores oportunistas que atacan a las presas de forma violenta y a lo largo de su vida desarrollan una amplia gama de tácticas para encontrar y capturar a sus presas (Pickett *et al.*, 1994; Wheeler y Alwyne, 1975).

Las lubinas juveniles forman cardúmenes que varían de una docena de individuos a muchos miles, lo que depende de la dureza de las condiciones ambientales locales o del



FAO

La lubina, *Dicentrarchus labrax* L.

año. Los investigadores sugieren que la lubina puede permanecer en varios grupos distintos a lo largo del tiempo, y que pueden conservar su comportamiento de cardumen durante la mayor parte de sus vidas. Por otra parte pueden desarrollar comportamiento agresivo y territorial. Cuando una lubina se ve amenazada por un animal más grande se retira rápidamente o adopta una postura de defensa típica. Apareta ser más grande mostrando al agresor tantas espinas agudas como le es posible. No hay evidencias de comportamientos agresivos entre lubinas de tamaño similar, aunque pueden ser territoriales cuando ocupan las zonas de alimentación a lo largo del verano (Pickett *et al.*, 1994; Wheeler y Alwyne, 1975).

La lubina se reproduce sexualmente mediante fertilización externa. La época de puestas de la lubina depende de la temperatura del agua y del fotoperiodo, por lo que varía con la latitud, siendo más temprana en latitudes más bajas, p.e. de diciembre a marzo en Marruecos, y más tardía en latitudes más altas, p.e. hay puestas durante Julio en Irlanda (Barnabé y Billard, 1984). La temperatura proporciona una señal importante para la iniciación de la freza, ya que los huevos de la lubina raras veces se encuentran donde el agua está por debajo de los 8.5-9.0° Celsius o por encima de los 15° Celsius. Cada hembra madura puede producir entre un cuarto y la mitad de un millón de huevos por kilogramo de su propio peso corporal. Los huevos de la lubina son planctónicos y eclosionan entre 4 y 9 días después de la fertilización, según la temperatura del mar. Durante los siguientes 2 o 3 meses, las larvas en desarrollo van a la deriva desde el mar abierto hacia la costa, introduciéndose en calas, remansos y estuarios. Estos hábitats abrigados son utilizados por las lubinas juveniles durante los 4 o 5 años siguientes, antes de que maduren y adopten las costumbres migratorias de los adultos (Pickett *et al.*, 1994).

LAS GÓNADAS DE LOS TELEÓSTEOS.

Las gónadas de los teleósteos y las de todos los vertebrados tienen dos funciones, producir gametos y esteroides sexuales. Estos últimos tienen un papel importante en la regulación de la reproducción a través de los mecanismos de retroalimentación sobre el eje CHG, su influencia en la maduración de los gametos y en la formación de los



caracteres sexuales secundarios y también tienen funciones autócrinas sobre la producción de péptidos gonadales, tales como la activina y la inhibina.

La mayor parte de los teleósteos son gonocorísticos, es decir los individuos mantienen el mismo sexo durante toda su vida. Éste es el caso de la lubina. Sin embargo, entre los teleósteos se encuentran especies hermafroditas. En la mayor parte de estos casos se produce una inversión del sexo gonadal a lo largo del desarrollo; por ejemplo, la dorada (*Sparus aurata*) es hermafrodita protándrico, a partir del primer o segundo año algunos machos se convierten en hembras, mientras que el Pargo (*Pagrus pagrus*) es hermafrodita protogínico, las hembras se transforman en machos.

El testículo de los teleósteos

Los testículos de los teleósteos son pares y en la mayoría de las especies, incluida la lubina, se extienden a lo largo de toda la cavidad abdominal (Blüm, 1985). Generalmente poseen organización lobular o tubular (Nagahama, 1983). Los de la lubina son del tipo lobular, que consisten en un gran número de lóbulos separados entre si por tejido conjuntivo. En el interior de los lóbulos se produce la espermatogénesis. Las células germinales se agrupan en cistos y maduran hasta convertirse en espermatozoides. El tipo tubular no es tan común como el lobular, es el caso del gupi (*Poecilia reticulata*). Los cistos se forman en el extremo ciego de los tubos cerca de la periferia del testículo y van llenando por completo el espacio interno de los tubos testiculares conforme avanza la espermatogénesis. A lo largo de la espermatogénesis los cistos migran a través de los tubos, situándose los más inmaduros en la zona superficial del testículo y los más maduros en el interior.

En los teleósteos, igual que en mamíferos, los testículos se componen de un gran número de tubos o lóbulos seminíferos, que contienen células germinales y células somáticas o de Sertoli. Entre los lóbulos seminíferos hay tejido conjuntivo que contiene capilares sanguíneos y las células de Leydig. Los receptores para la FSH y la LH suelen estar localizados en las células de Sertoli y de Leydig. Las células de Sertoli se

encuentran dentro de los lóbulos y están unidas unas a otras por complejos de unión formando una barrera entre la sangre y el interior del testículo. Las células de Sertoli se encargan de fagocitar las células germinales dañadas y producen proteínas que son segregadas al lumen de los tubos seminíferos o a los vasos sanguíneos. Se ha descrito en mamíferos (Yen y Jaffe, 1991) que las células de Sertoli son el lugar donde actúan la FSH y la testosterona (T), la FSH estimula a la proteína de unión a andrógenos a que se una a la T. En los teleósteos, las células de Sertoli conforman la envoltura de los espermatocitos de los tubos y lóbulos seminíferos que contienen las distintas fases de las células germinales masculinas (Blüm, 1985; Nagahama, 1983). Las células de Leydig se sitúan en el tejido intersticial entre los tubos seminíferos y, como en otros vertebrados, son las principales células productoras de esteroides. En los teleósteos los esteroides que mayoritariamente se sintetizan en los testículos son los andrógenos T y 11-ketotestosterona (11KT) y los esteroides inductores de la maduración (MIS), las progestinas $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\beta$ P) y $17\alpha,20\beta,21$ -trihidroxi-4-pregnen-3-ona (20β S). La producción de esteroides varía a lo largo del ciclo reproductor y difiere entre especies distintas, sobretodo la de progestinas. En algunos estudios se ha descrito una pequeña producción de estrógenos por la gónada masculina (Fostier *et al.*, 1983, 1987).

La espermatogénesis comienza con la división mitótica de las espermatogonias. Hay dos tipos de espermatogonias, primarias o secundarias, o tipo A y B, siendo las primarias mayores que las secundarias (Nagahama, 1983). Las espermatogonias proliferan mediante la mitosis seguida de la meiosis. Las espermatogonias de tipo A son células remanentes mientras que las espermatogonias B realizan la meiosis y entran en la espermatogénesis. Después de la primera división meiótica aparecen dos espermatocitos secundarios que se dividen en espermátidas tras la segunda división meiótica. Las espermátidas no son gametos masculinos funcionales, para ello tienen que pasar por un proceso de diferenciación llamado espermiogénesis que las transforma en espermatozoides. Toda la espermatogénesis ocurre dentro del ciste, incluida la espermiogénesis. Durante la espermiación, las espermátidas maduran a espermatozoides, el ciste se abre y estos

últimos se liberan al lumen, en este momento aparecen los machos espermiantes que emiten semen ante un ligero masaje abdominal. El espermatozoide de los teleósteos se divide morfológicamente en cabeza, tallo y cola. A diferencia de los espermatozoides de otros vertebrados, los de los teleósteos carecen de acrosoma, un orgánulo que contiene enzimas lisosomales fundamentales para atravesar la zona pellúcida del óvulo. En los huevos de los teleósteos hay una pequeña apertura llamada micropilo a través de la cual el espermatozoide penetra en el óvulo. La producción de andrógenos y la espermatogénesis suceden al mismo tiempo en los mamíferos y en muchos teleósteos, incluida la lubina, mientras que en otros teleósteos como el espinoso, *Gasterostus aculeatus*, están separadas cronológicamente (Borg, 1994). La espermatogénesis se divide en dos tipos, prenupcial y postnupcial, dependiendo de su momento de inicio. El tipo prenupcial es el más común en los peces y el de la lubina, consiste en que la espermatogénesis se inicia un tiempo antes de la época de apareamiento. Una vez finaliza la freza o frezas los testículos retroceden a la inmadurez y la espermatogénesis se para hasta que el ciclo se repite (Billard *et al.*, 1982). En el caso del espinoso la espermatogénesis es postnupcial, es decir que se produce inmediatamente después de la freza y los gametos permanecen inactivos hasta la siguiente temporada de apareamiento (Borg, 1982). Hay algunas especies como el gupi, *P. reticulata*, que pueden reproducirse todo el año y entonces tienen una espermatogénesis continua.

El tamaño de los testículo varía a lo largo de todo el año, alcanzando los índices gonadosomáticos máximos ([peso de la gónada/peso del cuerpo] x 100, GSI) en la época de apareamiento. Posteriormente el GSI declina a los valores mínimos hasta el inicio de la espermatogénesis. En las especies con espermatogénesis postnupcial el GSI máximo se alcanza después de la freza cuando la espermatogénesis está más activa y no hay secreción de esperma (Borg, 1982).

El ovario de los teleósteos

A diferencia de los mamíferos, los teleósteos adoptan muchas estrategias reproductoras distintas, siendo la más común el oviparismo pero dándose en algunas

especies el viviparismo y el ovoviviparismo (Nagahama, 1983). Esta diversidad ha dado lugar al diseño de varios tipos de ovarios y de aparatos reproductores femeninos. En general, se componen por un órgano par y la estructura del folículo ovárico en crecimiento es muy similar en la mayoría de especies. El ovario está formado por oogonias, oocitos, células foliculares, tejido conjuntivo y vasos sanguíneos. El crecimiento de los oocitos se divide en tres fases: la previtelogénesis, la vitelogénesis y la ovulación (Nagahama, 1983).

El oocito se localiza en el interior del folículo y está rodeado de células foliculares. Estas últimas son una capa interna de células de la granulosa y una capa externa de células de la teca. Entre las dos capas de células y separándolas se sitúa una lámina basal. El folículo de los teleósteos se diferencia del de los mamíferos en que las células de la granulosa forman una capa celular de varios estratos.

Las primeras fases de la ovogénesis son similares a las de la espermatogénesis, las oogonias proliferan mediante divisiones mitóticas y se transforman en oocitos primarios. En este estado los cromosomas se encuentran en la fase de diploteno de la primera profase de la meiosis y los oocitos comienzan a crecer. Durante el crecimiento la membrana plasmática del oocito se transforma introduciendo largas microvellosidades entre el oocito y la capa de células de la granulosa. En este espacio comienza la formación del huevo. El siguiente paso es la vitelogénesis, que se caracteriza por un crecimiento rápido debido a la acumulación de proteínas. La vitelogenina es el precursor principal de las proteínas de la yema, se sintetiza en el hígado que la libera al torrente circulatorio y el torrente circulatorio la transporta hasta el ovario. El hígado también sintetiza las proteínas de la envoltura vitelina del oocito (Hyllner y Haux, 1995). Después de que el oocito cese su crecimiento y se complete la primera división meiótica, se produce la ovulación y los huevos pasan a la cavidad ovárica. Una vez ovulados, los huevos continúan la meiosis hasta la segunda metafase meiótica, lo que se conoce como maduración. En este punto los huevos están preparados para ser expulsados y fertilizados.

Las GTHs y las hormonas esteroideas del ovario regulan el crecimiento de los oocitos y sus fases de maduración y por tanto juegan un papel fundamental en la

producción de gametos (Nagahama, 1993). Los esteroides se sintetizan mayoritariamente en las células de la teca y de la granulosa y sus niveles varían considerablemente a lo largo del ciclo reproductor (Fostier *et al.*, 1983). Las células de la teca producen Γ que es absorbida por las células de la granulosa donde se transforma en 17β -estradiol (E_2) (Nagahama, 1983, 1987). El aumento de los niveles de la FSH al inicio del crecimiento oocitario y a lo largo de la vitelogénesis en los salmónidos (Swanson, 1991) estimula la producción de E_2 (Sumpter *et al.*, 1991). El E_2 estimula al hígado para que sintetice la vitelogenina y la vitelina. La LH aumenta durante la ovulación y la maduración oocitaria, procesos en los que están implicadas las progestinas producidas por el folículo ovárico: $17,20\beta$ P, 20β S, 17α -hidroxiprogesterona y otras.

Las lubinas hembra son ovíparas y frezan durante el invierno, a lo largo del cual tienen de una a cuatro deposiciones de huevos (Asturiano *et al.*, 2000). El desarrollo ovárico de la lubina se denomina sincrónico por grupos, es decir que los oocitos a lo largo del período de maduración y ovulación se desarrollan en varios grupos con diferente grado de madurez, lo que da lugar a varias frezas.

LA HIPÓFISIS Y EL HIPOTÁLAMO DE LOS TELEÓSTEOS

La hipófisis juega un papel crucial en el control endocrino de la reproducción. La hipófisis de los teleósteos y de todos los vertebrados está formada por la adenohipófisis y la neurohipófisis.

La neurohipófisis de los teleósteos es la parte nerviosa de la glándula hipofisiaria. Se encuentra en su parte posterior, y está inervada directamente por terminaciones nerviosas procedentes del hipotálamo. Los productos de secreción de estas neuronas (neurohormonas) se liberan directamente sobre la red de vasos sanguíneos neurohipofisiarios, que a su vez los envían al torrente circulatorio general. No hay un relevo sináptico como ocurre en la adenohipófisis. Las neurohormonas hipotalámicas se liberan directamente a través de la neurohipófisis. Las hormonas que se han identificado en la neurohipófisis de los teleósteos pertenecen a la familia de los péptidos relacionados

con la vasopresina, en mamíferos también se libera la oxitocina que está implicada en las contracciones del parto.

En los tetrápodos las neuronas hipotalámicas drenan sus factores hipofisiotrópicos en un largo vaso portal de la eminencia media, que constituye la porción más basal del hipotálamo y que conecta, a su vez, con el tallo hipofisiario. Estos factores son rápidamente capturados por los capilares del sistema portal que irrigan la adenohipófisis, alcanzando así las células secretoras vía sanguínea. En los teleósteos, no existe sistema portal hipofisiario y los terminales nerviosos de las neuronas hipotalámicas inervan directamente las células secretoras de la adenohipófisis (Gorbman, 1995). Los factores hipofisiotrópicos segregados en la adenohipófisis son los factores de inducción de la secreción de varias hormonas hipofisiarias al sistema circulatorio, tales como la prolactina (PRL), hormona del crecimiento (GH), somatolactina (SL), adrenocorticotropina, hormona estimulante del melanóforo, hormona estimulante de la tiroides (TSH), FSH y LH. La adenohipófisis se divide en tres partes en función de la distribución de los tipos celulares que producen cada hormona: pars distalis rostral, pars distalis proximal y lóbulo intermedio o pars distalis intermedia (Van Oordt y Peute, 1983; Weltzien *et al.*, 2004).

Las GTHs se sintetizan en la pars distalis de los teleósteos, generalmente en su parte ventral (Kawauchi *et al.*, 1989; Swanson, 1991). La FSH y la LH de los teleósteos se sintetizan en células separadas de la hipófisis, en contraste con lo que sucede en los tetrápodos que las sintetizan juntas en las mismas células (Nozaki *et al.*, 1990a, b; Naito *et al.*, 1991, 1993). En el caso de los salmónidos y la anguila, *Anguilla anguilla*, las células gonadotropas se encuentran dispersas en la pars distalis rostral y en la pars distalis proximal (Van Oort y Peute, 1983). En el caso de la trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss*, las gonadotropas que producen la LH se localizan en la región central de la pars distalis proximal y las que producen FSH en la región periférica de la pars distalis proximal (Nozaki *et al.*, 1990a, b).

El encéfalo controla las células gonadotropas mediante dos sistemas hipotalámicos, el primero estimula la síntesis y secreción de las GTHs mediante el GnRH y el segundo

las inhibe con la dopamina, también conocida como el factor inhibidor de las gonadotropinas (GRIF).

Hasta la fecha se han identificado 16 formas de GnRH en el sistema nervioso de los vertebrados y protocordados (Adams *et al.*, 2002; Montaner *et al.*, 2001). El descubrimiento de GnRHs en moluscos (Zhang *et al.*, 2000) y protocordados (Fernald y White, 1999; King y Millar, 1992; Powell *et al.*, 1994a) indica que se trata de un péptido antiguo y bien conservado (con la posible excepción del péptido similar al GnRH recientemente descubierto en el pulpo, Iwakoshi *et al.*, 2002). Las diferentes formas se conocen por el nombre de la especie en la que se aislaron primero, a excepción del GnRH de mamíferos (mGnRH). Se han aislado nueve formas distintas en los cerebros de los peces: sGnRH en salmón keta (*Oncorhynchus keta*; Sherwood *et al.*, 1983), lGnRH I y lGnRH II en lamprea (*Petromyzon marinus*; Sherwood *et al.*, 1986; Sower *et al.*, 1993), cfGnRH en pez gato (*Clarias macrocephalus*; Bogerd *et al.*, 1992; Ngamvongchon *et al.*, 1992), dfGnRH en melga (*Squalus acanthias*; Lovejoy *et al.*, 1992), sbGnRH en dorada (*Sparus aurata*; Powell *et al.*, 1994b), hrGnRH en el arenque (*Clupea harengus pallasii*; Carolsfeld *et al.*, 2000), pjGnRH en pejerrey (*Odontesthes bonariensis*; Montaner *et al.*, 2001) y wfGnRH en corégono de lago (*Coregonus clupeaformis*; Adams *et al.*, 2002).

En los cerebros de mamíferos, aves, reptiles y de los teleósteos más primitivos, salmónidos (Okuzawa *et al.*, 1990), anguilas (Dufour *et al.*, 1993; Okubo *et al.*, 1999), carpas (Yu *et al.*, 1988) y peces gato (Bogerd *et al.*, 1992; Schulz *et al.*, 1993) se encuentran dos formas diferentes de GnRH, que difieren en estructura, localización, distribución y origen embriológico. En los teleósteos modernos (Gothilf *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 1994b) y anfibios (Yoo *et al.*, 2000), aparece una tercera forma de GnRH. Sin embargo recientemente se han descubierto tres GnRHs distintos en el arenque (Carolsfeld *et al.*, 2000), una especie que apareció antes que los salmónidos, y en el corégono de lago que es un salmónido primitivo (Adams *et al.*, 2002). Este hecho plantea la cuestión de como se perdió una de estas formas en la evolución posterior de los salmones, carpas y peces gato.

En la misma especie, las diferentes formas se expresan en distintos núcleos del encéfalo (Carolsfeld *et al.*, 2000; González-Martínez *et al.*, 2001; Gothilf *et al.*, 1996). Todos los teleósteos, y todos los vertebrados gnatóstomos, expresan GnRH-II de pollo (cGnRH-II) en el tegmento del mesencéfalo (Senthilkumaran *et al.*, 1999). Muchos teleósteos más evolucionados también expresan sGnRH en el ganglio del nervio terminal y en el bulbo olfativo ventromedial (Montaner *et al.*, 2001), por el contrario en estas áreas los peces primitivos expresan mGnRH (Lescheid *et al.*, 1995) o cfGnRH (Ngamvongchon *et al.*, 1992). El tercer tipo de GnRH difiere entre especies, pero ha sido el sbGnRH el que se ha identificado en muchos teleósteos evolucionados (Powell *et al.*, 1994b; Powell *et al.*, 1995; Powell *et al.*, 1997). Sin reparar en el tipo, la tercera forma de GnRH siempre se expresa en el área preóptica, allí donde las fibras de GnRH se proyectan hacia la pituitaria (Gothilf *et al.*, 1996; Okuzawa *et al.*, 1997; Parhar *et al.*, 1998; Powell *et al.*, 1994b; Powell *et al.*, 1995; White *et al.*, 1995). Como en otros teleósteos evolucionados la lubina posee tres formas de GnRH, sbGnRH, sGnRH y cGnRH-II. Se localiza sGnRH en el telencéfalo de la lubina con proyecciones nerviosas que alcanzan la pituitaria, sbGnRH en el área preóptica, hipotálamo mediobasal y sus terminaciones alcanzan la pars distalis de la pituitaria, y cGnRH-II se distribuye de forma dispersa por el encéfalo posterior y no alcanza la pituitaria (Zmora *et al.*, 2002).

Además, hay otras moléculas implicadas en la regulación de las GTHs desde el encéfalo, como sistemas peptidérgicos (NPY y péptidos opioides), monoaminérgicos (epinefrina, serotonina), aminoacídicos (GABA, taurina, glutamato y aspartato). Además de los esteroides gonadales que participan en la regulación de la secreción. Estos últimos pueden actuar bien sobre las células gonadotropas o modulando los sistemas GnRH y GRIF (revisiones de Blázquez *et al.*, 1998a; Breton *et al.*, 1993; Kah *et al.*, 1993; Peter *et al.*, 1991).

Otras hormonas hipofisarias aparte de las GTHs también tienen implicaciones en la reproducción. Así, los niveles plasmáticos de la SL en machos y hembras maduras de salmón, *O. kisutch*, se correlacionan de modo positivo con los esteroides y alcanzan los niveles máximos durante la freza (Rand-Weaver y Swanson, 1993). Los niveles

plasmáticos e hipofisiarios de la SL se reducen tras la gonadectomía, lo que sugiere que la gónada estimula la síntesis y secreción de la SL (Mayer *et al.*, 1998). De modo similar otras dos hormonas relacionadas estructuralmente con la SL, la PRL y la GH (Eand-Weaver *et al.*, 1991; 1992) estimulan la esteroidogénesis en los teleósteos (Le Gac *et al.*, 1992; 1993). Además se han identificado receptores para la PRL y la GH en las gónadas de teleósteos (Edery *et al.*, 1984; Le Gac *et al.*, 1992).

Por otra parte y como apunte, se ha relacionado la actividad tiroidea con la función reproductora en varias especies (revisión de Cyr y Eales, 1996). Hay una correlación entre los niveles de las hormonas tiroideas y la maduración gonadal. Además la administración de GnRH y GTHs afecta a los niveles de las hormonas tiroideas y viceversa.

LAS HORMONAS GONADOTROPAS

En 1931 Fevold y sus colaboradores descubrieron en extractos de la hipófisis anterior de mamíferos dos sustancias gonadotrópicas diferentes, una activaba el crecimiento y la otra la luteinización de los folículos ováricos. Posteriormente a estas sustancias se las llamó FSH y LH respectivamente. En otros grupos de tetrápodos, reptiles, anfibios y aves, también se encontraron dos GTHs con estructura y función biológica similar a la LH y FSH de los mamíferos (Burzawa-Gérard, 1982; Licht *et al.*, 1977).

Las GTHs son proteínas glicosiladas con cadenas de polisacáridos, y dada su función hormonal se incluyen en el grupo de las hormonas glicoproteicas. La TSH está estructuralmente relacionada con las GTHs y se sintetiza, como las GTHs, en la adenohipófisis, pero por otro tipo celular, las células tirotropas. En animales tetrápodos se encuentra, además, la gonadotropina coriónica (CG) que se segrega en la placenta de los primates y los equinos. Estas cuatro hormonas conforman la familia de las hormonas glicoproteicas, se trata de una familia con interrelaciones tanto estructurales como evolutivas (Pierce y Parson, 1981).

La naturaleza de las GTHs de teleósteos se ha estudiado intensamente a lo largo de las dos décadas pasadas. Una de las mayores controversias surgió en determinar cuántas GTHs se requerían para llevar a cabo las numerosas actividades asociadas con la reproducción. Estas actividades comprenden la vitelogénesis, esteroidogénesis, maduración oocitaria y ovulación en las hembras y la espermatogénesis y espermiación en los machos.

En un principio se aisló una sola GTH de varias especies de teleósteos, a la que se llamó GTH de maduración (Burzawa-Gérard y Fontaine, 1972; Burzawa-Gérard, 1982). Esta GTH estimula todas las actividades del proceso reproductor, sin embargo los niveles plasmáticos de la hormona permanecen bajos o indetectables hasta que se llega al período de la maduración (Fontaine y Dufour, 1987). Esta observación sugirió que más de una hormona estaría implicada en la reproducción de los peces. El equipo formado por Kawauchi y sus colaboradores caracterizó definitivamente las dos GTHs utilizando hipófisis de salmón, y las llamó GTH-1 y GTH-2 (Kawauchi *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 1988a). Mediante análisis filogenético y alineamientos de secuencias se ha demostrado que la GTH-1 y GTH-2 de los peces son respectivamente homólogas a la FSH y la LH de los tetrápodos (Quérat, 1994, 1995; Quérat *et al.*, 2000). Los estudios fisiológicos apoyan esta homología. La GTH-1 alcanza los niveles más altos de expresión génica, síntesis proteica y secreción al comienzo del ciclo reproductor, mientras que la GTH-2 incrementa estos niveles cuando el ciclo está más avanzado (Bon *et al.*, 1999; Breton *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 1999; Prat *et al.*, 1996; Slater *et al.*, 1994; Weil *et al.*, 1995;). Así que la GTH-1 está implicada en el control de la pubertad y la gametogénesis y la GTH-2 regula la maduración gonadal y la freza (Schulz *et al.*, 2001; Swanson, 1991). Estas homologías de las GTHs de los peces con las de tetrápodos han llevado a muchos autores a proponer una nomenclatura unificada, abandonando la terminología de GTH-1 y GTH-2 y usando los términos FSH y LH en los peces. Nomenclatura que se usa en esta tesis.

La FSH y la LH se han aislado, ya sea mediante purificación proteica y/o clonando de sus RNAs mensajeros, en un gran número de especies de peces, en salmónidos (Gen *et al.*, 1993; Govoroun *et al.*, 1997; Kato *et al.*, 1993; Sekine *et al.*, 1989; Swanson *et al.*,

1991), ciprínidos (Chang YS *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1997; Van der Kraak *et al.*, 1992; Yoshiura *et al.*, 1997), perciformes (Copeland y Thomas, 1993; Elizur *et al.*, 1996; García-Hernández *et al.*, 1997; Gen *et al.*, 2000; Hassin *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1999; Koide *et al.*, 1993; Okada *et al.*, 1994), anguiliformes (Yoshiura *et al.*, 1999) condrósteos (Quérat *et al.*, 2000) y elasmobranquios (Quérat *et al.*, 2001). Las únicas especies en las que sólo se ha podido identificar la LH son la anguila (*A. anguilla*; Quérat *et al.*, 1990) y el pez gato (*Clarias gariepinus*; Koide *et al.*, 1992), a pesar de que se han realizado numerosos esfuerzos por encontrar la FSH.

Estructura molecular de las GTHs

Las GTHs de teleósteos se componen, al igual que en mamíferos, por las subunidades α y β (Suzuki *et al.*, 1988b). En el caso de la FSH son las subunidades α y β FSH y en el de la LH las subunidades α y β LH. El péptido α es el mismo en las dos GTHs, mientras que las subunidades β FSH y β LH pertenecen específicamente a la FSH y a la LH. Todas las hormonas glicoproteicas tienen en común la subunidad α , incluyendo a la CG de mamíferos placentarios y a la TSH. Mientras que la subunidad β es específica de cada una de las glicohormonas. Las subunidades son proteínas de talla intermedia, el tamaño de las subunidades α , β FSH y β LH varía según especies y el rango fluctúa entre los 90 y 120 aminoácidos.

La estructura de las GTHs se ha descrito utilizando el análisis cristalográfico de la CG humana, ver los trabajos de Laphorn y colaboradores (1994) y Wu y colaboradores (1994) revisados por Dinshaw (1994), y más recientemente se ha estudiado en la FSH humana (Fox *et al.*, 2001). La estructura básica de la CG y la FSH humanas es similar. Además, la CG humana está relacionada estrechamente con la LH, dada la similitud de la secuencia de sus subunidades β , por lo que su estructura debe ser muy semejante. Así que la estructura básica que se ha descrito puede tomarse como general para la familia de las hormonas glicoproteicas.

Tanto en la CG como en la FSH de humanos, el heterodímero que forman las subunidades α y β adopta una forma alargada, está constituido principalmente por conformación β de lámina plegada y las dos subunidades se encuentran entrelazadas y unidas por puentes no covalentes. El núcleo de cada subunidad contiene un nudo formado por cisteínas, un puente disulfuro que une dos segmentos de la subunidad pasa por el centro de un círculo de ocho aminoácidos correspondientes a otros dos segmentos que

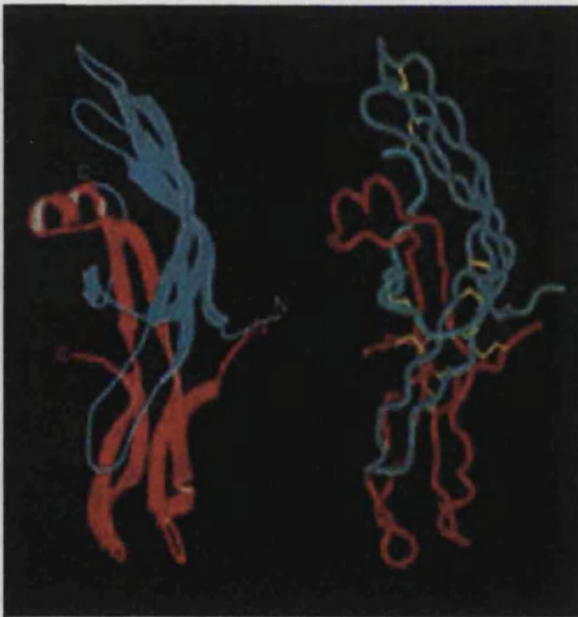


Fig. 2:

a. Representación en cinta del heterodímero de la hCG con la cadena α en rojo y la β en azul. Se han señalado los extremos amino y carboxi y se han omitido los puentes disulfuro.

b. Representación del esqueleto del heterodímero de la hCG visto en orientación similar. La cadena α en rojo y la β en azul; los residuos $\beta(90-111)$ en azul claro y los puentes disulfuro en amarillo.

Dinshaw JP. Nature 1994; 369:438-439

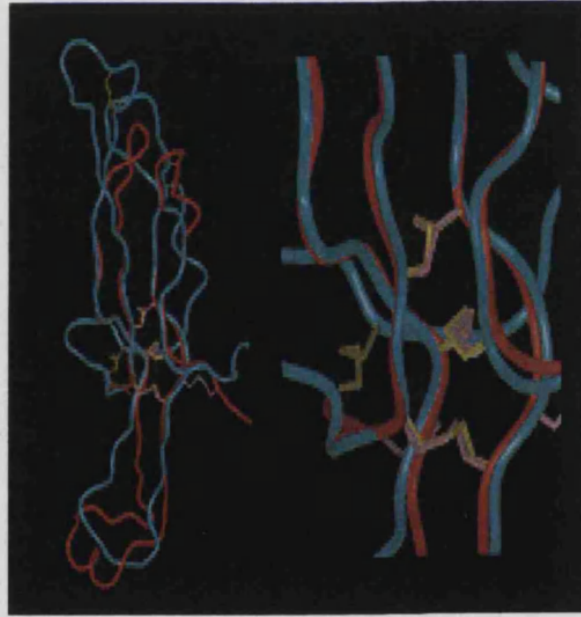


Fig. 3

Superposición de las subunidades α y β la hCG.

a. Vista de la subunidad α (en rojo, con los puentes disulfuro en rosa) y la subunidad β (en azul con los puentes disulfuro amarillos).

b. Ampliación que muestra la estructura común que adopta el nudo central de cisternas.

Dinshaw JP. Nature 1994; 369:438-439

están unidos por otros dos enlaces entre cisteínas (Fig. 3b). A partir del núcleo de las dos subunidades α y β se proyectan un par de brazos en la misma dirección, se trata de dos

brazos similares y de planos paralelos (Fig. 2a). En la dirección opuesta se proyecta un brazo único. Ambas subunidades muestran gran similitud (Fig. 3a), que es máxima en la región del núcleo de cisteínas (Fig. 3b). Las diferencias entre las dos subunidades se observan en el tamaño total y en la estructura y longitud de los brazos. La diferencia más notable entre las subunidades α y β se encuentra en el extremos del brazo solitario, el de la subunidad α tiene un segmento rico en prolinas que provoca un viraje súbito de la conformación β en lámina plegada a estructura de hélice α . Por el contrario el de la subunidad β mantiene la conformación β y forma un lazo más abierto.

Cuando α y β se alinean para formar la estructura cuaternaria del dímero casi se forma un eje de simetría (Fig. 2). Las subunidades se asocian íntimamente a través de las superficies de contacto. Las mayores interacciones moleculares entre las dos subunidades se dan en el corazón del dímero. Y también en el último segmento del extremo carboxi-terminal (color azul claro en Fig. 2b) de la subunidad β . Este segmento abraza mediante un lazo cerrado por tres puentes disulfuro a la subunidad α . Esta estructura, que se la ha comparado con un cinturón de seguridad, tiene implicaciones en el mecanismo de acoplamiento del heterodímero, ya que este mecanismo se gobierna por el orden en el que se forman los puentes disulfuros. Otra característica del heterodímero es la gran proporción entre la superficie y el volumen, que da como resultado una molécula estrecha con un núcleo hidrofóbico mínimo.

Todo los indicios apuntan a que otros miembros de la familia de las hormonas glicoproteicas, como la LH y la TSH, poseen en común con la CG y la FSH humana el nudo de cisteínas, el cinturón del extremo carboxi-terminal, la estructura básica de molécula alargada y la conformación de los brazos de las subunidades. La diferencia más importante entre la CG y la FSH humana es la conformación de los extremos carboxilo y amino y del brazo solitario de la subunidad β . Éstas, junto a otras diferencias menores en la secuencia de aminoácidos, pueden resultar fundamentales para la especificidad de la unión al receptor y la acción sobre la transducción de la señal (Arnold *et al.*, 1998).

En cuanto a la glicosidación de las GTHs se ha observado que influye en la permanencia en el sistema circulatorio, en su degradación y su bioactividad (Baenzinger.,

1994; Szkudlinski *et al.*, 1995; Ulloa-Aguirre *et al.*, 1995; Ulloa-Aguirre y Timossi, 1998; Ulloa-Aguirre A *et al.*, 1999). También afecta a la formación de los puentes disulfuro, la secreción, la estabilidad molecular, la unión al receptor y la señal de transducción (Feng *et al.*, 1995; Heikoop *et al.*, 1998; Van Zuylen *et al.*, 1997).

Organización genómica de las GTHs

Las subunidades α y β de la FSH y la LH de los teleósteos, al igual que las de los mamíferos, están codificadas por genes separados. Los genes de cada una de las tres subunidades se han clonado en varias especies que se incluyen entre los grupos más representativos de los teleósteos, salmónidos (Sekine *et al.*, 1989), ciprínidos (Kobayashi *et al.*, 1997; Yoshiura *et al.*, 1997), perciformes (Hassin *et al.*, 1995) y condrósteos (Quérat, 2001). En la mayoría de los genomas de los teleósteos se encuentra una sola

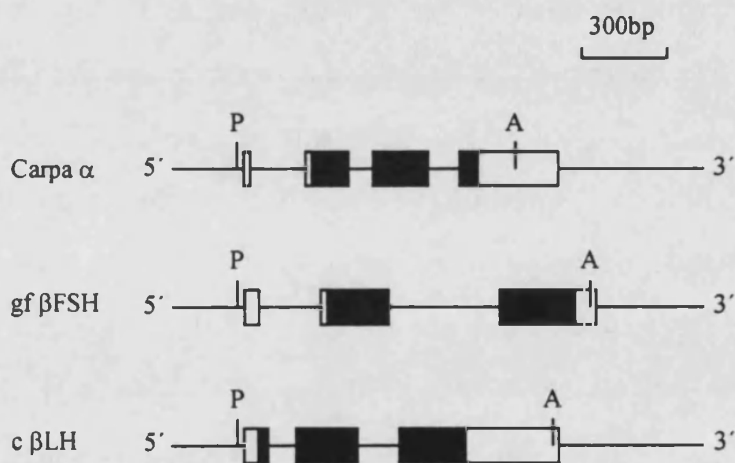


Fig. 4

Los genes de la subunidad α de *C. Carpio* (Huang *et al.*, 1992), la subunidad β FSH de *C. auratus* (gf β FSH; Sohn *et al.*, 1988) y la subunidad β LH de *C. Carpio* (c β LH; Chang *et al.*, 1992). "P" y "A" representan respectivamente la posible "TATAA box" y la señal de poliadenilación. Los segmentos negros indican las regiones codificantes y los blancos las no codificantes. Las líneas entre los segmentos señalan los intrones.

copia del gen de cada subunidad, pero en algunos salmónidos y ciprínidos, debido a que tienen dotación cromosómica tetraploide, pueden encontrarse dos copias distintas, que dan lugar a dos versiones diferentes de una misma subunidad. Así sucede con la subunidad α del salmón (*O. tshawytscha*), para la que se han descrito dos secuencias en el genoma (Suzuki *et al.*, 1995) y dos RNAs mensajeros diferentes (Kitahara *et al.*, 1988); en la carpa (*Cyprinus carpio*) se han descrito dos copias en el genoma de las subunidad α (Huang *et al.*, 1992); en la carpa dorada (*Carassius auratus*) se encuentran dos RNAs mensajeros de la subunidad α (Kobayashi *et al.*, 1997) y dos copias de la subunidad β FSH (Sohn *et al.*, 1998a).

Estructura del gen de la subunidad α

Burnside (1988) describió la organización genómica del gen de la subunidad α en humanos, bovinos, ratones y ratas. En todas estas especies el gen se compone de cuatro exones y tres intrones. La posición de los intrones está muy conservada entre las diferentes especies. Pero el tamaño de la unidad de transcripción del gen de la subunidad α varía considerablemente (de 8 a 16.5 kb), lo que se puede atribuir a diferencias en el tamaño del primer intrón (6.4, 13, 10 y 5.4 kb respectivamente en los genes de la subunidad α de humanos, bovinos, ratones y ratas).

Se ha descrito la estructura del gen de la subunidad α de dos especies peces. La organización genómica de la subunidad α de la carpa (*C. carpio*; Huang *et al.*, 1992) y el salmón (*O. tshawytscha*; Suzuki *et al.*, 1995) es muy parecida a la de la subunidad α de mamíferos. Sin embargo la unidad de transcripción del gen es más corta (1.2 kb en la carpa y 1.1 kb en el salmón) debido a que los intrones son mucho más cortos.

Estructura del gen de la subunidad β

La secuencia genómica que codifica los genes de la subunidad β LH y β FSH de varias especies de mamíferos ha sido aislada y caracterizada (Gharib *et al.*, 1989). Los

genes de todas las subunidades β están formados por tres exones y dos intrones. A diferencia del gen de la subunidad α , los genes de las subunidades β son más pequeños, con una longitud de la unidad de transcripción de aproximadamente 1.5 kb para la β LH y 4 kb para β FSH, lo que se atribuye al tamaño considerablemente menor de los intrones. La localización de los intrones, al igual que en la subunidad α , está muy conservada. El primer intrón interrumpe la región del péptido señal o en su caso la región 5'-no trasladada (5'-UTR). El segundo intrón se localiza tres aminoácidos antes del quinto residuo de cisteína de la subunidad β , una posición estrictamente conservada en todas las subunidades β identificadas hasta ahora, incluyendo las β TSHs que se han codificado de varias especies (Tatsumi *et al.*, 1988).

Se ha aislado el gen de la subunidad β LH del salmón (*O. tshawytscha*), con una unidad de transcripción de (1.0 kb; Xiong y Hew, 1991), y el de la carpa (*C. Carpio*; 1.2 kb; Chang *et al.*, 1992). También el de la subunidad β FSH de la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (2.7 kb; Rosenfeld *et al.*, 2001) y dos subunidades β FSH diferentes de la carpa dorada (*C. auratus*; 1.7 y 1.5 kb; Sohn *et al.*, 1998a). Todos los genes de las subunidades β de los peces son similares entre ellos y a los genes de las subunidades β identificados en tetrápodos, a juzgar por el número, el tamaño y la localización de los intrones y exones.

Hipótesis actuales sobre el origen y la evolución de las GTHs.



Los árboles filogenéticos de las secuencias clonadas de la LH muestran claramente que la LH de los teleósteos está directamente relacionada con la LH tetrápodos (Quérat, 1994; 1995). El origen filogenético de la FSH es, sin embargo, más difícil de dilucidar. Esto se debe a que la subunidad β FSH ha sufrido una evolución en los teleósteos más rápida que la subunidad β LH. Este hecho provoca distorsiones en los árboles filogenéticos contruidos únicamente con subunidades β (Quérat, 1994; 1995). Para paliar este efecto, Li y Ford (1998) propusieron un árbol filogenético en el que las subunidades β se alineaban junto con las subunidades α comunes. En realidad, aunque concebible, no

hay ninguna evidencia de que la subunidad α y las subunidades β provienen de un gen ancestral común. Además, sólo cinco aminoácidos (cuatro cisteínas y una glicina) entre más de 150 aminoácidos estaban en posición alineada en el trabajo de Li y Ford (1998). Así que, la reconstrucción filogenética basada en esta alineación está sesgada (Quérat *et al.*, 2000) y no soluciona el problema de que la rápida evolución de las subunidades β FSH en los teleósteos dificulta la reconstrucción filogenética cuando sólo se toman las subunidades β .

Buscando la solución a este problema, Quérat y colaboradores (2000) clonaron los genes de las subunidades β de la FSH, LH y TSH de un condrósteo, el esturión (*Acipenser baeri*). Los condrósteos se separaron temprano en la línea de los actinopterigios, antes de que aparecieran los primeros teleósteos, considerándoseles un grupo más primitivo que estos últimos. Por tanto sus hormonas deben tener características más cercanas al antecesor común de actinopterigios y sarcopterigios (que incluyen a los tetrápodos) que las de los teleósteos. De hecho, la secuencia de la β LH del esturión está más cerca de las β LHs de los teleósteos primitivos que de las β LHs de los anfibios. Pero por el contrario, la β FSH y la β TSH del esturión tienen una semejanza mayor con las respectivas β FSHs y β TSHs de los anfibios que con las de teleósteos. Esto último discrepa con el hecho de que están evolutivamente más próximos a los teleósteos (ambos pertenecen a los actinopterigios que se separaron de los sarcopterigios hace aproximadamente 400 millones de años) que a los anfibios (un grupo taxonómico que divergió de la rama principal de los sarcopterigios hace aproximadamente 250 millones de años). La explicación a este hecho se puede encontrar en la mayor aceleración de la tasa evolutiva en los linajes de la β FSH y la β TSH de los teleósteos.

Los trabajos de Quérat identificaron tres linajes monofiléticos claramente definidos: TSH, FSH, y LH. Así que finalmente, las relaciones estructurales y filogenéticas de la FSH y LH de tetrápodos y teleósteos están en concordancia con los datos funcionales de síntesis, secreción, acción esteroidogénica y distribución de los receptores durante el ciclo reproductivo (Swanson, 1991; Swanson y Dittman, 1997). Teóricamente, hay tres árboles posibles para las gonadotropinas. En el primer árbol hipotético, las gonadotropinas son

monofiléticas (los linajes de las dos gonadotropinas se derivarían de un antepasado común directo), mientras que en los otros dos, las gonadotropinas son parafiléticas (los linajes habrían surgido por separado). Las diferentes hipótesis se pueden evaluar provisionalmente por el número de sinapomorfias que las apoyan; las distancias totales no pueden ser usadas debido a las diferencias en la tasa de evolución de los tres linajes. El primer árbol hipotético (monofilia de las gonadotropinas) parece ser más realista, pues está apoyado por el alto número de sinapomorfias. Por otro lado, la especificidad del receptor hormonal dentro de una especie dada se verá afectada más o menos por el grado de parentesco entre hormonas ortólogas. En este sentido, la LH es capaz de unirse al receptor de la FSH y de manera eficiente desplazar la unión de la FSH en el anfibio *Rana catesbeiana* (Takada *et al.*, 1986). Resultados similares se han obtenido en salmónidos con la FSH y la LH (Miwa *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1992). Estas observaciones abogan por una reciente individualización de la especificidad de las gonadotropinas y se inclinarían por la primera hipótesis filogenética, los linajes TSH, LH y FSH serían monofiléticos.

También se ha tratado de determinar el orden de aparición de las subunidades desde el gen ancestral común. Existía la propuesta de que la subunidad α y las subunidades β provenían de un gen ancestral común. Se propuso esta hipótesis por la pérdida de similaridad entre la subunidad α y las subunidades β de los mamíferos (Fontaine y Burzawa-Gérard, 1977), antes de que se describiera la estructura terciaria de ambas subunidades (Laphorn *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1994). Las subunidades α y β pertenecen a la superfamilia de péptidos con nudo de cisteínas, una familia que también contiene varios factores de crecimiento y otros péptidos (Isaacs, 1995; Sun y Davies, 1995). Las proteínas de esta familia comparten una topología común, pero tienen muy poca homología entre las secuencias. En otras palabras, su semejanza estructural no implica que compartan un origen común. Esto en realidad podría ser una convergencia estructural. En cualquier caso, la alineación de secuencias entre subunidades α y β (y posiblemente otros miembros de la familia) para una reconstrucción filogenética deberían estar basados en el núcleo de nudos de cisteína ya que es el elemento estructural común de la familia. Li y Ford (1998) no se basaron en esto para su análisis filogenético de la

familia de las hormonas glicoproteicas, ya que no alinearon dos de las seis cisteínas del núcleo entre las subunidades α y β . Las inferencias filogenéticas de esta alineación están sesgadas. Se necesitarían más datos para asignar un origen común a las subunidades α y β de las hormonas glicoproteicas y conseguir un alineamiento fiable de sus secuencias. Por tanto sin conocer el gen ancestral común no se puede determinar el orden de aparición de los tres linajes de las subunidades.

Receptores de gonadotropinas

La FSH, la LH y la TSH se unen a receptores específicos, TSHR, FSHR y LHR que se expresan respectivamente en la tiroides y las gónadas (Dufau 1998; Kohn *et al.*, 1995; Simoni *et al.*, 1997). Estos receptores están compuestos de un dominio extracelular grande, un dominio transmembrana heptahelicoidal y un dominio citoplasmático corto (Fig. 5). Pertenecen a la familia de receptores de superficie celular acoplados a la proteína G de tipo rodopsina. El TSHR, FSHR Y LHR constituyen la subfamilia de los receptores de las hormonas glicoproteicas (GpHRs), que se diferencian de otros miembros por el gran tamaño de su dominio extracelular, que constituye la mitad de la proteína (Fig. 5). El dominio extracelular contribuye a la especificidad de la unión con el ligando, por lo tanto la homología de este dominio entre receptores es muy baja (Dufau 1998; Kohn *et al.*, 1995; Simoni *et al.*, 1997). La estructura primaria del cDNA de los receptores de la LH, FSH y TSH de los peces es homóloga a la de las aves (Mizutani *et al.*, 1998; You *et al.*, 1996) y los mamíferos (Dufau 1998; Kohn *et al.*, 1995; Simoni *et al.*, 1997).

Las primeras investigaciones del receptor de la GtH (GtHR) en peces se llevaron a cabo mediante análisis de unión al ligando. Al principio solo se dispuso de la LH, y sólo se encontró un tipo de receptor, el LHR (Kanamori y Nagahama, 1988). Sin embargo, una vez se aislaron las dos formas de las GtHs, Swanson y colaboradores (1991) purificaron la FSH y la LH, se usaron como ligandos para demostrar la existencia de dos formas de receptores. Al FSHR se le unió la FSH y la LH pero al LHR sólo se le unió la LH (Miwa *et al.*, 1994; Yan *et al.*, 1992).

Miwa y colaboradores (1994) localizaron en el salmón, mediante técnicas autoradiográficas, las células donde se unen las GtHs. El FSHR se ha localizado durante el crecimiento vitelogénico, tanto en las células intersticiales de la teca como en las de la granulosa, y durante la fase de maduración sólo se encuentra en las de la teca. En el testículo, se ha localizado en las células de Sertoli. Por contra la localización del LHR se restringe a la capa granulosa durante la fase de maduración y a las células de Leydig durante la espermatogénesis y la espermiación.

La expresión estacional de los genes de los GtHR se ha descrito en las hembras del pez gato, especie en la que los oocitos se desarrollan sincrónicamente. Los niveles de transcripción del FSHR son bajos durante todo el ciclo, salvo por un incremento que se produce después de la freza (Kumar *et al.*, 2001b). Este modelo de expresión del FSHR muestra alguna correlación con varios enzimas esteroideogénicos del ovario del pez gato (Kumar *et al.*, 2001b), lo que sugiere una relación con los mecanismos de regulación. Los niveles de transcripción del LHR (Kumar *et al.*, 2001a) se mantienen relativamente bajos durante la mayor parte del ciclo reproductivo excepto durante la maduración final oocitaria y la ovulación, momentos en los que la expresión aumenta bruscamente. En una comunicación preliminar, Hirai y colaboradores (1999) publicaron que la expresión del

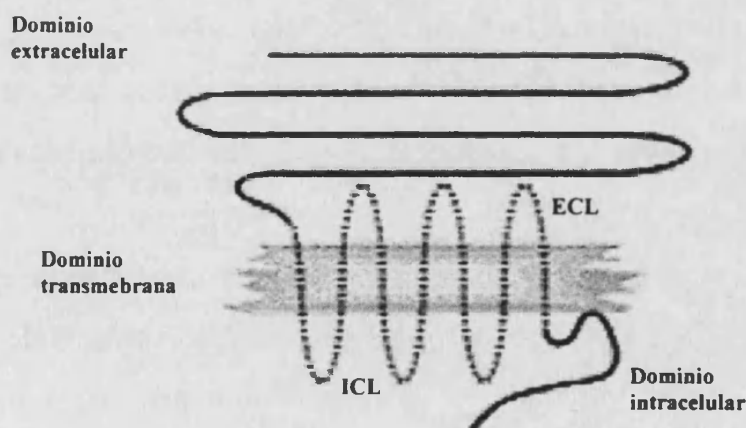


Fig. 5

Representación esquemática de la estructura de los receptores de las hormonas glicoproteicas. ECL e ICL indican respectivamente los lazos extracelulares e intracelulares del dominio transmembrana (la parte punteada de la proteína).

mRNA del FSHR de la tilapia (*Oreochromis niloticus*), una especie que tiene varias frezas, alcanzaba su punto máximo un día después de la puesta y que disminuye a partir de entonces, mientras que el LHR alcanzaba los niveles de expresión mayores en la ovulación. Así, el modelo de expresión génica en estas dos especies, que tienen una fisiología reproductiva notablemente diferente, es sumamente similar y sugiere que el FSHR se asocia con la recrudescencia ovárica y el LHR con la maduración final oocitaria y la ovulación. Además, estos patrones de expresión son compatibles con la expresión y las funciones conocidas de sus ligandos respectivos (la FSH y la LH) de varias especies de teleosteos (Swanson y Dittman, 1997). Sin embargo, el perfil de expresión de la FSH en salmónidos difiere de otros teleosteos, ya que hay un pico en el momento de la ovulación (Breton *et al.*, 1998), que es compatible con la expresión del FSHR en este grupo de peces (Oba *et al.*, 1999).

HORMONAS ESTEROIDEAS

Hasta la fecha actual se han descrito esteroides con funciones hormonales en animales vertebrados (esteroides sexuales y corticosteroides) y en artrópodos (ecdisteroides). El colesterol es el precursor de todas las hormonas esteroideas y se compone por cuatro anillos con un total de 27 átomos de carbono. El colesterol se transforma, a través de varios pasos intermedios en los que pierde seis átomos de carbono, en pregnenolona, con 21 átomos de C, y de la que derivan todas las hormonas esteroideas de los vertebrados.

Los testículos y los ovarios de los teleosteos sintetizan diversos esteroides que regulan varias funciones, la gametogénesis de las gónadas, la expresión de los caracteres sexuales secundarios, el comportamiento, el metabolismo general, así como ejercen efectos de retroalimentación en la hipófisis y el hipotálamo (para revisión ver Fostier *et al.*, 1983). Las hormonas esteroideas gonadales más importantes son los andrógenos, estrógenos y progestágenos. Los andrógenos (del griego *andros* = hombre y *genes* = lugar a) se pueden definir como las hormonas que estimulan los caracteres masculinos.

Las moléculas de los andrógenos están compuestas por 19 átomos de carbono, pero no todos los esteroides de 19 carbonos son andrógenos (para revisión ver Borg, 1994). Los estrógenos se componen por moléculas de 18 carbonos y por definición son las hormonas capaces de inducir el estro. El estro (del griego *oistros* = incordio, estímulo y frenesí) es un periodo recurrente en el que las hembras de mamíferos no humanas son receptivas sexualmente. Los progestágenos o progestinas son sustancias que tienen actividad similar a la de la progesterona (del latín *pro* = en favor de un; y *gestatus* = llevar en las entrañas). En los teleósteos, las progestinas no tienen función en el proceso del embarazo, pues no existe, pero se mantiene el término para los esteroides de 21 carbonos.

La testosterona (T) es el andrógeno testicular más importante en los mamíferos, se sintetiza en las células de Leydig y se segrega a la sangre. La T puede actuar directamente sobre las células de los órganos diana, o se transforma en 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) que es el andrógeno más potente en el hombre. El ovario de las mujeres produce cantidades pequeñas de T que estimulan la conversión de los andrógenos en estrógenos, no sólo porque sirve de sustrato, sino también porque lleva a cabo un efecto paracrino directo, mediante una estimulación de la actividad del enzima esteroidogénico (Yen y Jaffe, 1991).

Los ovarios de los mamíferos segregan estrógenos que se sintetizan en las células foliculares. El estradiol (E₂) es el estrógeno fisiológicamente activo más importante, ya que sus fluctuaciones dan lugar al ciclo estral de las hembras y a todos los cambios fisiológicos y orgánicos necesarios para preparar la ovulación. La progesterona se sintetiza en el *corpus luteum*, y se segrega en cantidades relativamente grandes a lo largo de la segunda mitad del ciclo estral. Durante el embarazo la placenta produce grandes cantidades de progesterona. Los testículos también pueden producir progesterona, pero en pequeñas cantidades. Los esteroides gonadales se segregan de manera continua y moderada en los machos, mientras que siguen un patrón de secreción cíclico en las hembras.

A lo largo de la mayor parte del ciclo reproductivo los peces machos segregan andrógenos. El andrógeno más importante de la mayoría de teleósteos, como la lubina, es

la 11KT y no la T (para revisión ver Fostier *et al.*, 1983; Borg, 1994). Sin embargo, en otras especies de teleósteos como los gupis, *P. reticulata*, la 11KT no es el andrógeno principal sino la T. En muchos peces los niveles de 11KT son más altos en los machos que en las hembras (Kime y Manning, 1982; Rosenblum *et al.*, 1985; Stuart-Kregor *et al.*, 1981), mientras que ese no es el caso de la T. En muchas de estas especies los 11-andrógenos son más efectivos para estimular la espermatogénesis que la T (Miura *et al.*, 1991). Otro efecto relacionado es la hipertrofia del riñón, un carácter secundario masculino del espinoso, *G. aculeatus*, en el que la 11KT es más potente que la T para inducirlo (Borg *et al.*, 1993). Los testículos de los teleósteos también sintetizan progestágenos (Fostier *et al.*, 1983), principalmente 17,20betaP a lo largo de la espermiación (Baynes y Scott, 1985; Mayer *et al.*, 1990; Ueda *et al.*, 1985). Los niveles plasmáticos de andrógenos alcanzan los máximos niveles al comienzo de la época de freza. Estos esteroides son las hormonas gonadales dominantes durante el período de espermatogénesis en muchos teleósteos. Conforme avanza la freza los niveles de T y la 11KT declinan al mismo tiempo que aumentan los niveles de las progestinas 17,20betaP y 20betaS o MIS, que alcanzan los niveles máximos en el período de espermiación. (Barry *et al.*, 1990; Baynes y Scott, 1985; Fitzpatrick *et al.*, 1986; Fostier *et al.*, 1987; Mayer *et al.*, 1990; Sakai *et al.*, 1989; Scott y Sumpter, 1989).

Los estrógenos y los progestágenos regulan el ciclo reproductor de las hembras de teleósteos. Los estrógenos dominan las primeras fases del ciclo de forma parecida a como sucede en los mamíferos. El folículo ovárico segrega E₂ ante el estímulo de las GTHs, el cual actúa sobre el hígado induciéndolo a producir vitelogenina, tal y como se ha discutido anteriormente. Conforme avanza la vitelogénesis y llega a su finalización, las concentraciones de E₂ decrecen y aumentan las de T (Scott *et al.*, 1980). Las hembras de los teleósteos producen T a concentraciones elevadas (ver Borg, 1994). De hecho, Mayer y colaboradores (1992) encontraron los niveles plasmáticos de T más altos en la hembra del *Salvelinus alpinus* que en el macho. Kagawa y colaboradores (1982) demostraron que en los salmónidos la T sintetizada por las células de la teca se transforma en E₂.

Posteriormente, al final de la maduración oocitaria y durante la ovulación, se segregan los MIS, la 17,20betaP y 20betaS (Nagahama, 1987; Slater *et al.*, 1994).

Se han encontrado un gran número de otros esteroides en los teleósteos, los cuales tienen importancia para el ciclo reproductor (para revisión ver Kime, 1993).

En la lubina macho se han medido los niveles plasmáticos de la T y la 11KT a lo largo del ciclo reproductor (Prat *et al.*, 1990). Tanto los niveles plasmáticos de T como los de 11KT aumentan progresivamente desde el comienzo de la espermatogénesis, y alcanzan los máximos en la primera mitad del período de freza (finales de Enero). Prat y colaboradores (1990) también midieron los niveles plasmáticos del E₂, la 17,20betaP y la T en lubinas hembras. La 17,20betaP se mantiene a niveles bajos a lo largo de todo el año, incluido el período de freza (Enero-Marzo). La T y el E₂ plasmático aumentan considerablemente en diciembre (oogénesis avanzada) y luego sufren incrementos mayores durante enero y febrero (la primera mitad del período de freza). Más recientemente, los trabajos de Asturiano y colaboradores (2000) afinaron en la medida de los niveles hormonales durante el período de maduración y ovulación. En las hembras, los niveles plasmáticos más altos de T se observaron durante la postvitellogénesis y el principio de la maduración, mientras que los niveles máximos del E₂ se alcanzaron en la vitellogénesis tardía. Además, detectaron por primera vez cambios significativos en los progestágenos plasmáticos de la lubina. El nivel más alto de 17,20betaP se observó durante la postvitellogénesis y el de 20betaS en la maduración final. Estos resultados sugieren que la 17,20betaP ejerce su papel en el comienzo de la maduración de las lubinas hembras y la 20betaS en el final. El trabajo de Asturiano y colaboradores (2002) hiló aún más fino y describió el patrón de la esteroidogénesis en las sucesivas frezas que producen las lubinas. Tal y como se ha comentado anteriormente, la lubina es una especie que desarrolla los oocitos en grupos sincrónicos. Se requiere un mecanismo que permita la maduración de los primeros grupos de oocitos sin inducir la maduración de los grupos posteriores. Así, se observó una elevación de la T y el E₂ plasmático previa a los picos de progestágenos, que coinciden con la ovulación-maduración de los diferentes grupos de oocitos o con aumentos de la producción de esperma en los machos. Después de cada

onda de progestágenos se produce un nuevo cambio en la esteroidogénesis gonadal, que causa otra elevación de la T y el E₂. Este modelo hormonal se repitió varias veces según el número de ovulaciones por hembra. Estos resultados sugieren un mecanismo, basado en cambios de la esteroidogénesis, que puede ser el responsable de la regulación del desarrollo ovárico sincrónico, la ovulación y la espermiación en esta especie. Además evidencia el papel de la 17,20betaP y 20betaS como los esteroides inductores de la maduración (MIS).

Aromatización

Los andrógenos T y androstenediona (A4) pueden aromatizarse y transformarse en estrógenos, mediante este mecanismo se sintetizan los estrógenos en el ovario, a través de una reacción que es reversible. La aromatización de los andrógenos también se produce en el sistema nervioso central de los gnatóstomos. El enzima aromatasa citocromo P450 se une a esteroides de 19 carbonos y cataliza una serie de reacciones, que consisten secuencialmente en hidroxilación, oxidación y eliminación del carbono 19.

El encéfalo de los teleósteos presenta actividad aromatasa y es entre unas 100 a 1000 veces más activa que en otros vertebrados (Callard *et al.*, 1981a; Timmers *et al.*, 1987). Aunque Gelinas y Callard (1997) encontraron que las células inmunoreactivas a la aromatasa no son más numerosas en el encéfalo de la carpa dorada que en el de los mamíferos o las aves, por lo que concluyeron que la mayor actividad aromatasa en los peces es intrínseca de cada célula y no debida a una mayor población de éstas. La actividad aromatasa en el encéfalo de los peces varía considerablemente entre especies y condiciones fisiológicas, pero generalmente se sitúa en el telencéfalo y el mesencéfalo, tanto en el hipotálamo como en el área preóptica, y no en el encéfalo posterior (Pasmanik y Callard, 1985). La pituitaria de los peces también posee actividad aromatasa (Andersson *et al.*, 1988; Callard *et al.*, 1981b). Por ejemplo, se ha observado *in vitro* la aromatización de A4 para transformarse en estrona en células gonadotropas aisladas de pez gato africano (de Leeuw *et al.*, 1985).

La aromatización juega un papel primordial en la determinación sexual. Piferrer y colaboradores (1994) demostraron que el tratamiento con inhibidores de la aromataasa durante la diferenciación sexual provoca que salmones (*Onchorynchus tshawytscha*) con dotación genética de hembras se desarrollen como machos normales y funcionales. El papel de la aromatización en los mecanismos de retroalimentación se discute más adelante.

Receptores de esteroides

La respuesta fisiológica a los esteroides está mediada a través de receptores específicos. Los receptores de esteroides se incluyen dentro de la súper familia de los receptores hormonales nucleares (Beato *et al.*, 1995; Mangelsdorf *et al.*, 1995). Estos receptores son intracelulares y ejercen su efecto a nivel del núcleo en el DNA genómico, es decir, el complejo hormona receptor se une a secuencias específicas de DNA y activa la síntesis de RNA mensajero que dará lugar a la síntesis de proteínas específicas. En otras palabras, los receptores actúan como factores de transcripción dependientes de un ligando y una vez activados se unen específicamente a secuencias consenso y regulan la transcripción de los genes diana (Beato *et al.*, 1995).

En teleósteos se han hallado varios receptores de esteroides para andrógenos, estrógenos y progestágenos. Muchos de ellos pertenecen a la familia de receptores nucleares, pero también se han descrito de otros tipos para algunos esteroides.

Los receptores de andrógenos son de varios tipos. Pasmanik y Callard (1988), usaron preparaciones de citosol del encéfalo de la carpa dorada y hallaron unión al receptor con la T, pero no con la 11KT. Además demostraron que había variaciones en el tiempo, la capacidad del receptor alcanza los niveles más altos en la época de freza. Gelinas y Callard (1997) emplearon anticuerpos del receptor nuclear de andrógenos de humanos y rata y encontraron células inmunoreactivas en el telencéfalo medio y ventral y los núcleos preópticos y paraventricular hipotalámico de la carpa dorada. En el caso de la 11KT se han encontrado indicios de que ejerce su acción a través de receptores que no

concuerdan con el tipo clásico de receptor nuclear. Jakobsson y colaboradores (1996) descubrieron que la 11KT se une específicamente a la fracción de las membranas del tejido del riñón del *G. aculeatus* y del encéfalo del salmón en vez de a la del citosol, la T por el contrario se une al citosol y no a la fracción de membranas.

El esteroide inductor de la maduración, el 17,20betaP, también tiene un receptor de membrana que se ha caracterizado en los ovarios de la trucha de mar moteada, *Cymocion nebulosus* (Patiño y Thomas, 1990) y la lubina americana, *Morone saxatilis* (King *et al.*, 1995).

El receptor de estrógenos (ER) es un receptor nuclear. Se ha demostrado presencia de ER en células gonadotropas de la pituitaria y en sistemas neuronales cerebrales que influyen en la función GnRH/GTH, como es el caso de los sistemas de la dopamina, NPY y GABA (Kah *et al.*, 1997). Algunas de estas células inmunoreactivas se sitúan cerca de células inmunoreactivas al GnRH, pero no existe ninguna evidencia de que haya coexpresión de los dos, al menos en la trucha arcoiris (Navas *et al.*, 1995). Las células inmunoreactivas al receptor de estrógenos en el encéfalo de la trucha arcoiris se sitúan en el telencéfalo ventral, la región preóptica y el hipotálamo mediobasal. Algunas células inmunoreactivas se sitúan además en el núcleo talámico y en la zona supracomisural del telencéfalo (para revisión ver Kah *et al.*, 1993).

MECANISMOS DE RETROALIMENTACIÓN

La secreción de muchas hormonas, probablemente todas, está regulada mediante sistemas de circuito cerrado conocidos como mecanismos de retroalimentación (en inglés *feedback*). Consisten en que una señal genera una respuesta que, a su vez, influye sobre la fuente originaria de la señal. El sistema endocrino está organizado mediante un conjunto de estos mecanismos, que actúan entre distintas células y también entre distintos órganos. Son de dos tipos, positivos y negativos. La mayor parte de las hormonas forman parte de circuitos de retroalimentación homeostáticos (negativos) en los que cada hormona mantiene su propio ritmo de secreción dentro de unos límites (Fig. 6). El mecanismo de

retroalimentación positiva no es tan común, en él una hormona A estimula la producción/secreción de una hormona B, que a su vez estimula la producción de la hormona A en lugar de disminuirla (Fig. 6).

La regulación de la secreción de la LH y la FSH, en las células gonadotropas de la pituitaria de los peces, está bajo el control de varios sistemas de control por retroalimentación que operan dentro del eje CHG. El sistema de retroalimentación más importante es el de los esteroides gonadales, que pueden regular la secreción de las hormonas gonadotropas, tanto a través de su acción en los centros neurosecretores hipotalámicos como por control directo en la hipófisis.

Retroalimentación negativa

La retroalimentación negativa es el mecanismo de retroalimentación más común en los vertebrados y también de los peces. Un ejemplo típico de este mecanismo, asociado al eje CHG, es el que se produce cuando se gonadectomiza a un pez adulto. Cuando se eliminan las gónadas, los niveles de FSH y LH se elevan, posteriormente si

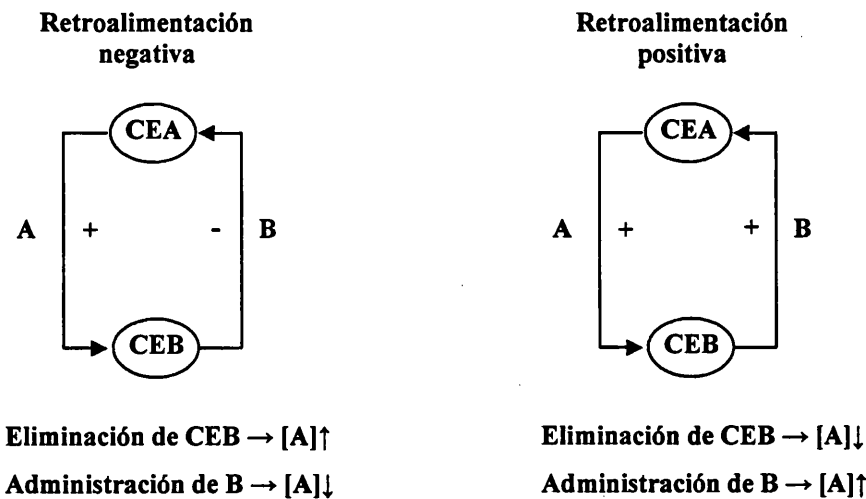


Fig. 6

Representación esquemática de un circuito de retroalimentación positivo y negativo. + = estimulación; - = inhibición; CEA = célula endocrina A; CEB = célula endocrina B; A = hormona A; B = hormona B.

administramos hormonas gonadales la secreción de GTHs cesa (Larsen y Swanson, 1997). La sensibilidad de la retroalimentación negativa de las hormonas gonadales sobre las GTHs sufre una variación estacional en varios mamíferos (ver, Hotchkiss y Knobil, 1994). Por ejemplo la secreción de LH y FSH aumenta en los humanos cuando envejecen o después de la menopausia, momentos en los que descienden los niveles de esteroides. La retroalimentación negativa de los esteroides parece que actúa a nivel hipotalámico, mediante la alteración de la amplitud y la frecuencia de los pulsos de secreción del GnRH (Shupnik, 1996a). Hasta la fecha no se ha dilucidado el mecanismo y las vías mediante las que se produce esta regulación.

El primer indicio de una acción negativa de los esteroides sexuales sobre la secreción de GTHs data de los inicios de los años 50 (ver revisión de Goos, 1987). Se ha detectado, morfológicamente, la activación de las células gonadotropas en varias especies de peces después de realizada la gonadectomía en *Xiphophorus maculatus* (Schreibman, 1964) y *G. aculeatus* (Borg *et al.*, 1985). La actividad gonadotrópica de la pituitaria de la hembra del pez gato indio, *Heteropneustes fossilis*, se suprime tras la inyección de E₂ y T, además de causar inhibición de la vitelogénesis y atresia de los oocitos maduros (Sundararaj y Goswami, 1968). Antes del descubrimiento de las dos GTHs en los teleósteos, varios estudios demostraron que la gonadectomía estimula la secreción de la GTH (LH). Billard y colaboradores (1977) observaron que los niveles plasmáticos de GTH se incrementaban tras la castración de machos de trucha arcoiris maduros. Van Putten y colaboradores (1981) y de Leeuw y colaboradores (1986) observaron, respectivamente, incrementos de la GTH plasmática en truchas arcoiris ovariectomizadas y peces gato africanos castrados. Los esteroides pueden suprimir el aumento de la GTH tras la gonadectomía. Los niveles de GTH aumentan en la carpa dorada gonadectomizada, mientras que la administración de implantes de E₂ y T en ejemplares ovariectomizados da como resultado niveles más bajos de GTH, al mismo tiempo que los niveles hipofisarios de GTH no se ven afectados (Kobayashi y Stacey, 1990). El efecto de retroalimentación negativa de los esteroides también se ha encontrado en salmones machos y hembras castrados (Larsen y Swanson, 1997). Los efectos negativos de las gónadas sobre la

secreción de GTHs dependen, al menos en machos, del estado de maduración. Larsen y Swanson (1997) demostraron que el aumento de los niveles de FSH después de la castración ocurre tanto en la espermatogénesis tardía y en la espermiación, mientras que el aumento de la LH solo se produce en los peces espermiantes.

Otras hormonas no esteroideas procedentes de las gónadas pueden influir en la reproducción de los teleósteos. El funcionamiento del sistema de los péptidos activina e inhibina se conoce en los mamíferos, estos péptidos ejercen acciones de retroalimentación sobre la regulación de la secreción de las GTHs (Yen y Jaffe, 1991). Las activinas e inhibinas de los mamíferos funcionalmente actúan de manera antagónica; la inhibina disminuye la producción de FSH, mientras que la activina estimula la secreción de FSH. Este sistema también parece que funciona en los peces ya que se ha demostrado que actúa en la carpa dorada (Ge *et al.*, 1993; Ge y Peter, 1994).

Retroalimentación positiva

El único mecanismo de retroalimentación positiva que se ha estudiado en profundidad es el que ocurre entre la LH y el E_2 durante el ciclo menstrual de las hembras de los mamíferos. El incremento gradual de los niveles plasmáticos de LH estimula la producción de E_2 en el ovario. El E_2 para ser efectivo debe alcanzar y mantener durante un período de tiempo unos niveles altos (Hotchkiss y Knobil, 1994). Niveles altos de E_2 más breves dan como resultado un efecto de retroalimentación negativa. La elevación de los niveles de E_2 hasta este punto elevado induce un incremento acusado de la secreción de la LH, que se conoce como la “oleada preovulatoria” (del inglés *pre-ovulatory surge*) de la LH, que induce la ovulación. Una vez alcanzados los niveles máximos de la LH plasmática, éstos declinan a pesar de la presencia de concentraciones elevadas de estrógenos. La oleada de la LH se puede inducir en ratas inmaduras y ovariectomizadas mediante inyecciones de E_2 (Shupnik, 1996 a y b). Por otra parte, los niveles basales de la transcripción de los genes de las subunidades LH β y FSH β varían a lo largo del ciclo estral de las ratas. La transcripción de la LH β varía con el E_2 , los niveles de transcripción más

altos se producen en el proestro en el momento de la oleada de la LH (Shupnik, 1996 a y b).

En los machos no se observa la retroalimentación positiva de los estrógenos tan bien como en las hembras. La administración de estrógenos antes y durante la pubertad de los hombres jóvenes suprime inicialmente la secreción de LH, que seguidamente da lugar a una retroalimentación positiva modesta (Veldhuis 1991). Sin embargo, el pico de respuesta de la LH no es mayor que los niveles iniciales de la LH en los controles. Algunos efectos de retroalimentación negativa se han encontrado en hombres y monos machos orquidectomizados así como en machos con hipogonadotropismo (Hotchkiss y Knobil, 1994), en los que la administración de E₂ puede iniciar elevaciones de la LH. Pero los mecanismos de retroalimentación positiva no parecen jugar un papel fisiológico importante en el control de la reproducción de los machos sanos de los mamíferos, al contrario de lo que sucede en las hembras. Este caso ilustra la complejidad de los mecanismos de retroalimentación durante la reproducción, ya que aunque no parece que exista una retroalimentación positiva en los machos, sí que hay elementos positivos en el eje reproductor. Un ejemplo más es la retroalimentación positiva de la T, pero no del E₂, sobre la expresión del RNA mensajero de la subunidad FSH β en cultivo de células de pituitaria provenientes de ratas macho (Shupnik, 1996b).

Los esteroides sexuales provocan retroalimentación positiva sobre la LH en los salmones machos sexualmente inmaduros. Tras la implantación con T en el encéfalo o la hipófisis de salmones juveniles los niveles de GTH (presumiblemente LH) se incrementan (Crim y Peter, 1978; Crim y Evans, 1979). Los niveles plasmáticos e hipofisarios de GTH no se alteran significativamente en truchas arcoiris juveniles machos y hembras solamente castradas (Crim *et al.*, 1982). Ahora bien, si inyectamos GTH se produce un fuerte incremento de en el contenido hipofisario de GTH en los controles operados, pero no en las truchas macho castradas (Crim *et al.*, 1982). Lo que demuestra que bajo la estimulación de la GTH, el testículo de los juveniles induce la acumulación de GTH en la pituitaria. Crim y colaboradores (1981) encontraron que la T, y en menor medida la A4, 11KT y 11 β -hidroxitestosterona, aumentan el contenido de

GTH en la hipófisis de las truchas arcoiris inmaduras. Tras el tratamiento con T (Crim y Evans, 1983) los niveles plasmáticos de GTH en la trucha arcoiris aumentan y se induce la espermatogénesis.

El E₂, la T y la 11KT tienen un efecto positivo en los niveles hipofisarios de la LH, pero no en los de la FSH de los salmones juveniles (Swanson y Dickoff, 1988). El E₂ incrementa el nivel de transcripción de la LHB de los salmones inmaduros, pero no altera los niveles de transcripción de la FSH y la subunidad α (Dickey y Swanson, 1995). Tal y como se ha descubierto en mamíferos, la acción positiva de los esteroides se ejerce directamente en la pituitaria, actuando sobre los genes de las gonadotropinas. El estradiol estimula específicamente la transcripción del gen de la subunidad LHB en ratas, el mecanismo de acción consiste en una interacción directa del complejo del receptor de estrógenos con un elemento regulador de estrógenos (ERE) dentro del gen de la subunidad LHB (Shupnik y Rosezweig, 1991). Se han encontrado secuencias del ERE en el gen de la LHB del salmón, lo que sugiere un mecanismo de acción similar en los peces (Xiong *et al.*, 1994b). También se ha encontrado un posible ERE en el gen de la subunidad FSHB de la tilapia (Melamed *et al.*, 1998).

La retroalimentación positiva de la T sobre la LH depende de la actividad aromatasas, al menos en salmónidos (Breton *et al.*, 1997; Crim *et al.*, 1981; Swanson y Dickhoff, 1988; Xiong *et al.*, 1994a,b,c). El efecto estimulante de la T sobre la acumulación de LH, en la pituitaria de la trucha arcoiris juvenil, disminuye con el tratamiento del inhibidor de la aromatasas ATD (Crim *et al.*, 1981). Cuando se administra el andrógeno no aromatizable 11KT también se produce una estimulación de la LH, pero más débil que con la T (Crim *et al.*, 1981; Swanson y Dickhoff, 1988).

También se han encontrado mecanismos de retroalimentación positiva en otras especies. La metiltestosterona (MT) tiene efectos positivos sobre los orgánulos de síntesis proteica de las células gonadotropas del espinoso, *G. aculeatus*, durante el invierno en condiciones de fotoperiodo corto (Borg *et al.*, 1986). El aparato de Golgi y el retículo endoplasmático rugoso (RER) aumentan su tamaño y el de sus cisternas. La ultraestructura de las células gonadotropas de los peces tratados con MT es similar a la de

los ejemplares no tratados durante la época de freza (Borg *et al.*, 1985). Durante la época de freza de otras especies se han descrito ultraestructuras similares (ver revisión de Van Oordt y Peute, 1983). Las células de Leydig y las gonadotropas aumentan su actividad con la MT. Además los espinosos castrados y estimulados con fotoperiodos largos durante el invierno dilatan menos el RER que los peces no operados y estimulados (Borg *et al.*, 1989). Estos resultados sugieren la existencia de un mecanismo de retroalimentación positiva en los espinosos machos. El sistema de secreción de las GTHs de las hembras de la carpa dorada, *C. auratus*, presenta mecanismos de retroalimentación positivos y negativos (Kobayashi *et al.*, 1989; Kobayashi y Stacey, 1990). La oleada de GTH que se produce durante la ovulación en las hembras de carpa dorada viene precedida de niveles altos de T que provocan una retroalimentación positiva. Si se administra E₂ no se inhibe la oleada de GTH ni la ovulación (Kobayashi *et al.*, 1987a; Pankhurst y Stacey, 1985). El E₂ induce una retroalimentación positiva en las células gonadotropas de la anguila, *A. anguilla*, tanto en agua dulce como salada (Olivereau y Chambolle, 1978). Dufour y colaboradores (1983) observaron que las células gonadotropas de las anguilas de ambos sexos proliferan tras la inyección intraperitoneal de E₂ y que el efecto es dependiente de la dosis. El contenido hipofisiario de LH en la anguila aumenta tras la administración de extracto hipofisiario, la gonadectomía suprime este efecto (Dufour *et al.*, 1989). En el caso de la T en las anguilas, estimula el contenido hipofisiario de LH de los machos pero no de las hembras. Y se ha demostrado un mecanismo de retroalimentación positiva por la T, pero no por el E₂, sobre la LH de células hipofisiarias cultivadas *in vitro* (Huang *et al.*, 1997). Los andrógenos no aromatizables, androstenediol y DHT, también inducen este mecanismo de retroalimentación positiva (Huang *et al.*, 1997).

REGULACIÓN HIPOTALÁMICA DE LAS GONADOTROPINAS

El GnRH, tanto por si mismo como mediante complejas interrelaciones entre el GnRH y los esteroides gonadales, desempeña un papel fundamental en la regulación de la

síntesis y secreción de las GTHs de los vertebrados (ver Shupnik 1996a). El receptor del GnRH pertenece a la familia de los receptores de superficie celular acoplados a la proteína G de tipo rodopsina. La estructura básica de los receptores de GnRH es similar a la de los receptores de gonadotropinas que se han descrito anteriormente. La diferencia más aparente es que el receptor de GnRHs tiene un dominio extracelular más pequeño que el de GTHs (Sealfon *et al.*, 1997). La unión del GnRH con su receptor desencadena una compleja cadena de segundos mensajeros y de interrelaciones entre ellos que dan como resultado la regulación de la secreción y la síntesis de las gonadotropinas. La acción del GnRH sobre los segundos mensajeros incluye la movilización de calcio y la activación de las fosfolipasas C y A2 y las proteinkininas C y activadora de mitógenos (para revisión ver Naor *et al.*, 1998; Shacham *et al.*, 2001).

Los GnRHs en los teleósteos, al igual que en otros vertebrados, se segregan en la pituitaria y se unen a receptores específicos de las células gonadotropas que estimulan la síntesis y secreción de las GTHs (Habibi y Peter, 1991). La distribución cerebral de los GnRHs varía en los teleósteos, tal y como demuestran las técnicas inmunocitoquímicas con anticuerpos específicos o la hibridación *in situ*. Este hecho cuestiona el significado funcional de las diversas formas de GnRHs (Montero y Dufour, 1996). Como ejemplo, los niveles del mGnRH son más altos que los del cGnRH II en la pituitaria y muchas áreas cerebrales de las hembras de la anguila plateada, además sólo los niveles del mGnRH aumentan durante la maduración sexual (Dufour *et al.*, 1993), estos datos indican que el mGnRH es fisiológicamente más importante que el cGnRH II durante el proceso reproductor de la anguila. Los salmones tienen dos formas cerebrales de GnRH, el sGnRH y el cGnRH II, pero sólo se ha encontrado sGnRH en la pituitaria en distintos momentos del ciclo reproductivo (Amano *et al.*, 1992, 1993; Okuzawa *et al.*, 1990). Por otra parte, tanto el cfGnRH y el cGnRH II inducen la secreción *in vivo* de la LH en el pez gato (Schulz *et al.*, 1993). Zohar y colaboradores (1995) encontraron que en el encéfalo de doradas hembras tres tipos de GnRHs, sGnRH, cGnRH y sbGnRH, estimulan la secreción de la LH; la sbGnRH es la forma más abundante en la pituitaria pero la menos potente para inducir la secreción.

Se pueden emplear inyecciones de análogos sintéticos de los GnRHs para elevar los niveles plasmáticos de la LH y de los esteroides sexuales en los peces, lo que promueve la ovulación y la espermiación (Donaldson y Hunter, 1983). Esta propiedad de los análogos de los GnRHs se ha utilizado en el cultivo industrial de varias especies de peces para controlar artificialmente el momento de la puesta (Zohar, 1996). En la lubina se ha estudiado la potencia de varias formas de GnRHs para liberar la LH e inducir la puesta (Forniés *et al.*, 2004). Además, en la lubina se han utilizado otros métodos de administración como las microesferas biodegradables y los implantes no biodegradables, que liberan los GnRHs sintéticos de forma lenta y continuada, lo que da como resultado la inducción de múltiples puestas (Forniés *et al.*, 2001).

La dopamina (DA), al contrario que el GnRH, inhibe la secreción de las GTHs (Chang JP *et al.*, 1990; Peter *et al.*, 1991). La estimulación de la ovulación es más potente cuando se administra de forma conjunta análogos del GnRH con antagonistas de la DA, que cuando se administra el GnRH solo en el *Paramisgurnus dabryanus* (Lin *et al.*, 1991), este hecho se ha repetido en otras especies de ciprínidos y salmónidos. Sin embargo, la DA no inhibe la secreción de la LH en el corvinón brasileño, *Micropogonias undulatus* (Copeland y Thomas, 1989) y otras especies de perciformes, lo que señala que hay diferencias específicas de cada especie entre los mecanismos de regulación de las GTHs.

El GABA es un aminoácido que actúa como neurotransmisor y también se ha encontrado que estimula la secreción de la LH en las carpas doradas al comienzo de la maduración, pero no en la maduración y en el período de inactividad sexual tras el retroceso gonadal (Kah *et al.*, 1992). El efecto positivo del GABA sobre la secreción de la LH parece originarse a varios niveles, el GABA estimula la liberación del GnRH y disminuye la actividad de las neuronas inhibitoras dopaminérgicas, además tiene un efecto directo sobre las células gonadotropas (Trudeau y Peter, 1995).

La distribución cerebral de la serotonina (5-HT) en los peces y los mamíferos es similar, Kah y Chambolle (1983) describieron que hay células y fibras nerviosas inmunoreactivas a la 5-HT en la pars distalis de la pituitaria de la carpa dorada. La 5-HT

Introducción General

influye en el control de la secreción de la prolactina (PRL) en los mamíferos, está directamente relacionada con la patofisiología del síndrome premenstrual de los humanos (Yen y Yaffe, 1991). Entre los efectos de la 5-HT en los teleósteos se pueden citar los siguientes, estimula la secreción de la LH en la carpa dorada (Somoza y Peter, 1991) y el corvinón brasileño (Khan y Thomas, 1992) actuando directamente a nivel hipofisiario. Por el contrario, los niveles hipofisarios de la 5-HT no se correlacionan con el estado reproductivo del sistema hipofisiario de la trucha arcoiris (Hernández-Rauda *et al.*, 1996).

Las neuronas inmunoreactivas al neuropéptido Y (NPY) se encuentran a lo largo del encéfalo de la trucha arcoiris, alcanzando las mayores densidades en el telencéfalo y el hipotálamo, así como en la pituitaria (Danger *et al.*, 1991). El NPY está involucrado en la secreción de la GTH, a través de acciones directas sobre las células gonadotropas e indirectas por medio de la secreción del GnRH (ver revisiones de Peter *et al.*, 1991; Kah *et al.*, 1993). Esta situación es similar en los mamíferos, donde el NPY es un neuromodulador excitador de la secreción del GnRH y la GTH (Yen y Yaffe, 1991). A lo largo del ciclo reproductor de las hembras de la carpa dorada el efecto del NPY sobre la secreción de LH varía, los peces maduros con los niveles altos de esteroides son los que alcanzan una mayor secreción de la LH bajo el efecto de la estimulación del NPY (Peng *et al.*, 1993). Los trabajos de Cerdá-Reverter y colaboradores (2000 a y b) han demostrado la presencia del NPY y de los péptidos relacionados, el péptido YY (PYY) y el péptido pancreático Y (PY), en áreas neurosecretoras implicadas en el control hipofisiario y concretamente de la función gonadotropa de la lubina. El NPY es capaz de inducir la secreción de la LH en la lubina, pero esta capacidad depende del estado energético de los animales, con lo que el sistema NPY actuaría como un modulador de la reproducción en función de la ingesta y el balance energético (Cerdá-Reverter *et al.*, 1999).



OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Los trabajos preliminares a esta tesis, obtenidos en nuestro laboratorio bajo el proyecto del CICYT, AGF 93-0127, en el que se estudiaban algunos de los factores ambientales y cerebrales que afectan a la aparición de la pubertad en la lubina (*D. labrax* L.), evidenciaron la existencia de un mecanismo de retroalimentación positiva inducido por los esteroides sexuales sobre el GnRH y los testículos en lubinas macho prepúberes. Estos trabajos dieron lugar a una publicación en la que J. Mateos aparece como coautor (Zanuy *et al.*, 1999) y que se incluye en el compendio de artículos de esta tesis. La continuación del estudio de los mecanismos de retroalimentación del eje reproductor y la de otros proyectos de investigación de nuestro grupo precisaban de una herramienta fundamental, el análisis de las fluctuaciones de las gonadotropinas en diferentes condiciones naturales y de experimentación. Bajo esta necesidad surgió el proyecto de esta tesis, que en un principio se adscribió al proyecto de investigación del CICYT, MAR95-1888-C03-01, cuyo objetivo era el estudio de las interacciones neuroendocrinas entre los procesos metabólicos y reproductores en la lubina. Aunque la pronta finalización de este proyecto llevó a que la financiación de esta tesis viniera de los proyectos de investigación de la Unión Europea, FAIR97-3785, y del CICYT, MAR 1998-1542-CE. Ambos proyectos tenían como objetivo dilucidar las bases moleculares y fisiológicas para la inducción de la puesta mediante el factor regulador de las gonadotropinas (GnRH) en la lubina y la dorada, así como dilucidar sus bases fisiológicas y moleculares. Además esta tesis también se ha financiado del proyecto de la OTAN, CRG940889, que tenía como objeto desarrollar inmunoensayos para las gonadotropinas de la lubina europea y americana.

De esta manera los objetivos han sido:

1. La obtención de gonadotropinas naturales purificadas de pituitarias de lubina y su caracterización bioquímica. Y con ellas desarrollar un método inmunoenzimático

(ELISA) para cuantificar las GTHs en el plasma, así como su almacenamiento, en la pituitaria de la lubina y otras especies afines.

2. La clonación y caracterización molecular de los genes de las subunidades de las GTHs. Y obtener métodos de cuantificación de los niveles de expresión génica de la GTHs basados en la técnica del Dot-blot.
3. Realizar experiencias fundamentales sobre las bases fisiológicas de la reproducción de la lubina. Las experiencias que se plantean son el estudio y la descripción de los ciclos de expresión, síntesis y secreción de las GTHs de las lubinas macho en cautividad; el mecanismo de actuación de los análogos del GnRH sobre las GTHs cuando se inoculan en lubinas hembras maduras para inducir la puesta; así como la descripción de los mecanismos de retroalimentación e interacción del GnRH y los esteroides sexuales sobre las GTHs en lubinas inmaduras.

ARTÍCULOS

Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (α , FSH β , and LH β) and their expression during the reproductive cycle

Jorge Mateos^a, Evaristo Mañanós^a, Gonzalo Martínez-Rodríguez^b, Manuel Carrillo^a, Bruno Quérat^c and Silvia Zanuy^a

^a *Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), Ribera de Cabanes s/n,
12595 Torre la Sal, Castellón, Spain*

^b *Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC), Avd. República Saharaui,
no. 2, 11510-Puerto Real, Cádiz, Spain*

^c *Laboratoire de Physiologie Générale et Comparée, UMR 8572 CNRS, Muséum
National d'Histoire Naturelle, 75231 Paris Cedex 05, France*

Abstract

Reproduction is controlled by two pituitary gonadotropin hormones, follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH). This study reports the cloning, sequence analysis, and gene expression of gonadotropin (GTH) subunits from the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). The GTH subunits were cloned from a sea bass brain-pituitary cDNA library. The nucleotide sequences of the common α , the FSH β , and the LH β subunit cDNAs were 625, 521, and 591 base pair (bp) long, respectively, encoding for mature peptides of 94, 105, and 115 amino acids (aa), respectively. Sequence analysis showed that sea bass FSH β is more similar to higher vertebrate FSH β 's (35–37%) than to LH β 's (26–30%), whereas sea bass LH β is more similar to LH β 's (40–53%) than to FSH β 's (26–41%). Phylogenetic analysis of fish GTH sequences grouped the β subunits into two groups, FSH and LH, distributed into four classes, corresponding to the accepted divisions of Elopomorphs, Ostariophysis, Salmonids, and Percomorphs. A dot-blot technique was developed to analyze GTH pituitary mRNA levels during the reproductive cycle of male sea bass. From October (initiation of gametogenesis) to February (spermiation), the expression of all three subunits in the pituitary increased in parallel, concomitantly with the gonadosomatic index (GSI) and the accumulation of LH protein in the pituitary, all values declining sharply at post-spermiation. This study demonstrates that the pituitary of sea bass contains two gonadotropin hormones and that both gonadotropins are probably involved in the control of gametogenesis, gamete maturation, and spermiation. © 2003 Published by Elsevier Science (USA).

Keywords: Gonadotropins; FSH; LH; Cloning; Gene expression; Reproduction; Sea bass; Fish

Introduction

The gonadotropins (GTHs), follicle-stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH), secreted by the pituitary gland, are the key hormones in the control of reproduction in vertebrates. The FSH and LH, together with a placental gonadotropin in primates (chorionic gonadotropin, CG) and the pituitary thyroid stimulating hormone (TSH), constitute a family of structurally related proteins, the glycoprotein hormones. They are heterodimers, constituted by a common α subunit and a hormone specific β subunit, each encoded by a single gene (Pierce and Parsons, 1981). The subunits are long peptide chains (around 100 amino acids) highly complex in structure, which is determined by the presence of different O- and N-linked oligosaccharide chains and the formation of cross-linked disulphide bonds between cysteine residues, localized at highly conserved positions in the subunit sequence (Hearn and Gomme, 2000). The non-covalent association of two subunits (alpha and beta) determines the formation and release of the bioactive dimeric hormone (Combarnous, 1992; Laphorn *et al.*, 1994).

It was long believed that the pituitary of fish synthesized a single gonadotropin, called maturational gonadotropin (GTH), which regulated all processes of reproduction. The existence of two gonadotropins was first established in a salmonid species, with the discovery of a new gonadotropin, called GtH-I (FSH-like), chemically different from the previously known maturational gonadotropin, or GtH-II (LH-like) (Kawauchi *et al.*, 1989; Suzuki *et al.*, 1988). Their nucleotide and amino acid sequences were determined (Sekine *et al.*, 1989) and further sequence analysis demonstrated that fish GtH-I and GtH-II were homologous to tetrapod FSH and LH, respectively (Quérat, 1994, 1995; Quérat *et al.*, 2000; Schulz *et al.*, 1995). This homology was supported by physiological studies, which showed that GtH-I (FSH-like) gene expression, as well as synthesis and release of the protein, was higher at the beginning of the reproductive cycle, whereas that of GtH-II (LH-like) increase later in the cycle (Bon *et al.*, 1999; Breton *et al.*, 1998; Gómez *et al.*, 1999; Prat *et al.*, 1996; Slater *et al.*, 1994; Weil *et al.*, 1995). These studies indicate that FSH is involved in the control of puberty and gametogenesis, whereas LH mainly

regulates final gonadal maturation and spawning (Schulz *et al.*, 2001a,b; Swanson, 1991), similarly as described for FSH and LH, respectively, in the case of higher vertebrates. The different temporal expression patterns of fish FSH and LH suggest different functions and different regulatory mechanisms for each gonadotropin. There is some information on the biological functions and regulation of LH secretion in fish (Trudeau, 1997), but very little is known about the FSH hormone and is mostly restricted to salmonid species. Cloning of FSH and LH subunits have been performed in several fishes, including salmonids (Gen *et al.*, 1993; Kato *et al.*, 1993; Sekine *et al.*, 1989), cyprinids (Chang YS *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1997; Yoshiura *et al.*, 1997), perciforms (Elizur *et al.*, 1996; Gen *et al.*, 2000; Hassin *et al.*, 1995; Jackson *et al.*, 1999), acipenseriforms (Quérat *et al.*, 2000), and elasmobranchs (Quérat *et al.*, 2001). These works have allowed obtaining some information on the regulatory mechanisms underlying gene expression of both hormones in different fish species. In the perciform fish striped bass, *Morone saxatilis*, both FSH β and LH β are expressed in the pituitary of juvenile fish (Hassin *et al.*, 1995) and in adult fish during the period of early spermatogenesis (Hassin *et al.*, 1998), with the expression of LH β higher than that of FSH β . In the gilthead sea bream, *Sparus aurata*, both transcripts are expressed similarly throughout the reproductive cycle (Elizur *et al.*, 1995). First studies on sea bass have shown that, in adult fish, all three GTH subunits are expressed during the period of sexual resting, with similar levels of pituitary FSH β and LH β mRNAs (Mateos *et al.*, 2002). Expression patterns of the GTH subunits in salmonid fish have shown that FSH β expression is much higher than that of LH β at pre-gametogenesis and early gametogenic stages, whereas LH β expression increases highly at the end of the reproductive cycle (Gómez *et al.*, 1999; Weil *et al.*, 1995), correlating the fluctuations of plasma FSH and LH levels in these species.

The Mediterranean sea bass is a perciform fish, highly appreciated in aquaculture. Puberty is attained at 2 years of age in males and at 3 years in females and then reproduction is repeated once a year during winter. The females present a group-synchronous type of ovarian development, producing 3–4 consecutive spawns during the

1–2 months spawning period (Asturiano *et al.*, 2000; Carrillo *et al.*, 1995). Gonadal development (Zohar *et al.*, 1984), patterns of vitellogenin secretion (Mañanós *et al.*, 1997), and hormonal profiles (Asturiano *et al.*, 2000; Mañanós *et al.*, 1997; Navas *et al.*, 1998; Prat *et al.*, 1990), have been described for this species throughout the reproductive cycle. Recently, the purification and development of specific immunoassays for sea bass LH, have provided some information on the release of LH during the reproductive cycle and its regulatory mechanisms (Mañanós *et al.*, 2002; Mateos *et al.*, 2002; Navas *et al.*, 1998). The aim of the present study was first, to demonstrate the existence of two gonadotropins (FSH and LH) in the pituitary of sea bass by means of molecular techniques and second, develop quantitative methods for the measurement of mRNA levels, to obtain information on GTH subunit gene expression during the reproductive cycle of the sea bass.

Materials and methods

RNA extraction and cDNA synthesis

For RNA extraction, pituitaries were obtained from adult male and female sea bass, reared at the facilities of the Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (East coast of Spain, 40°N 0°E), under natural conditions of photoperiod and temperature. Fish were anesthetized by immersion on 0.02% 2-phenoxyethanol (Sigma) and sacrificed by decapitation. Pituitaries were removed, immediately frozen on liquid nitrogen and stored at -80 °C before extraction. Total RNA was extracted from five pooled pituitaries using the TRI Reagent (Molecular Research Center, OH), following manufacturer's instructions. The RNA pellet was dissolved in DEPC-treated water and quantified by its absorbance at 260/280 nm. The quality of the RNA preparation was analyzed by electrophoresis on 0.8% agarose gels. The RNA (1 µg) was reverse transcribed for 90 min at 48 °C, using 10U of Superscript reverse transcriptase, in the presence of 0.2mM dNTP, 2 pM T₁₂ adapter, 5U RNAsin, and 0.01M DTT, in a final volume of 20 µl. All enzymes and reagents were from GibcoBRL (Grand Island, NY), unless specified.

Polymerase chain reaction and cloning strategy

The polymerase chain reaction (PCR) primers used for amplification of the α subunit cDNA were based on the sequence of *M. saxatilis* α cDNA (Hassin *et al.*, 1995). Amplification of the β subunit cDNAs was performed using degenerate primers, based on the nucleotide sequences of several fish species. The sequences of the oligonucleotides are listed below, where Y: C or T; R: A or G; W: A or T; M: A or C; K: G or T; S: G or C; D: G, A or T; and N: A, T, g or C.

α (sense):	5'-CCAGCATGGACTTATCAAAC-3'
α (antisense):	5'-CGGGATAGTCATCGTCTTC-3'
FSH β (sense):	5'-TGCRSYTSGTYSTYATGG-3'
FSH β (antisense):	5'-GTGWYKTYNGWSTTRCAY-3'
LH β (sense):	5'-TGYSAGCYMVTYAAYSARAC-3'
LH β (antisense):	5'-ATGCARARRTYDGGCYKMAG-3'

PCR amplification was performed in a final volume of 50 μ l, containing the cDNA template (one-tenth of the RT product), 0.2mM dNTPs, 100 (primers α) or 200 (primers β) pmol of oligonucleotides, and 5U of Vent DNA polymerase (New England Biolabs). The PCR procedure consisted on a first denaturation step at 95 °C for 5 min, followed by 2 min at 72 °C and 35 amplification cycles (1 min at 95 °C, 1 min at 47 °C, and 1 min at 72 °C), with a final elongation step of 5 min at 72 °C. The enzyme was added to the PCR mixture after the first denaturation step. The PCR products of the expected size were run on 1.5% agarose gels, transferred to Hybond-N⁺ nylon membranes (Amersham, South Clearbrook, IL), and hybridized with [α -³²P] dCTP-labeled probes (3000 Ci/mmol, Amersham), using the RadPrime DNA Labeling System from GibcoBRL, at a specific activity of around 100 cpm/ μ g. After hybridization, membranes were washed with 0.1x SSPE/0.1% SDS at 65 °C (3x30 min) and then exposed to X-ray films (Hyperfilm-MP, Amersham) at -80 °C. The probes were specific for *M. saxatilis* α , FSH β , and LH β

cDNAs (Hassin *et al.*, 1995) and were kindly provided by Dr. Y. Zohar, from the Center of Marine Biotechnology, University of Maryland, Baltimore, MD. The specificity of the *M. saxatilis* α , FSH β , and LH β probes for their respective *M. saxatilis* transcripts was previously tested at Dr. Y. Zohar's laboratory. The specific reactivity of these probes with the sea bass α , FSH β , and LH β transcripts, as well as the absence of cross-reactivity between them, was tested further in our laboratory by Southern-blot of sea bass genomic DNA, in which hybridization with each of the probes gave single bands of different sizes, under highly stringent conditions.

Total PCR products were ligated into PCR-Script Amp (Amersham Cloning Kit) and the plasmids used to transform *Escherichia coli* XL1-Blue MRF0 Kan supercompetent cells. Single colonies from transformed cells grown on LB plates were transferred to nylon membranes and identified, after hybridization with *M. saxatilis* [α -³²P]dCTP-labeled GTH probes. Plasmidic DNA from positive colonies was extracted. The size of the inserts was checked by electrophoresis, after digestion with SstI and PstI restriction enzymes and their sequences determined on fluorescence DNA sequencer (PE Applied Biosystems), using the dideoxy-nucleotide chain termination procedure.

Screening a cDNA library

A cDNA library was prepared in our laboratory (Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, Spain), from brains and pituitaries collected from mature male and female sea bass. From the pituitaries, total RNA was extracted using the TRI Reagent (Molecular Research Center, OH) and used to purify mRNA with the Polyatract mRNA isolation kit from Promega. The processes of cDNA synthesis, cloning, and packing were made using the Uni-Zap XR library construction kit #200450 from Stratagene, following manufacturer's instructions, in which the cDNA cloning is directional in XhoI and EcoRI from the pBSSK vector.

The λ ZAP phages were used for infection of *E. coli* XL1-Blue MRF' cultures, grown on LB medium supplemented with 0.2% maltose and 10mM MgSO₄. Serial

dilutions of λ ZAP phages growth were extended on Top Agar over NZY agar plates and were incubated for 6 h at 37 °C. Single plaques from transformed cells growth were transferred to Hybond-N⁺ nylon membranes. For hybridization, probes were labeled (RadPrime DNA Labeling System, GibcoBRL) with 3000 Ci/mmol [α -³²P] dCTP (Amersham), at a specific activity of around 100 cpm/ μ g. Membranes were hybridized overnight at 42 °C with the radiolabeled probes (5 ng/ml), in a solution containing 6x SSPE, 50% formamide, 5x Denhart's solution, 0.5% SDS, and 0.1 mg/ml yeast RNA. Membranes were then washed with 0.1x SSPE/0.1% SDS (3x30 min at 65 °C) and exposed to X-ray films (Hyper film-MP, Amersham), for 24 h at -80 °C. The λ ZAP phages of identified positive plaques were extracted in SM buffer with 2% CHCl₃ and used for a second screening step, using similar protocol conditions. Finally, cDNAs were purified from potential positive phages, subcloned into pBlueScript SK phagemid and sequenced.

The sequences of the isolated cDNAs were contrasted with sequences obtained from the NCBI database. Sequence analysis was performed using the Peptide Structure program, which predicted putative N-linked glycosylation sites. Alignment and identity analysis of the sea bass GTH cDNAs with the sequences from other vertebrates was performed with the DNAMAN 4.03 program (Lynnon BioSoft).

Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis was performed using PAUP version 4.0b [Swofford DL, 2000, PAUP, Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods); Sinauer Associates, Sunderland, MA]. Both maximum parsimony (full heuristic search) and distance matrix (Neighbor-joining) methods were used with default settings. The data set consisted of most of available (on EMBL data bank or from the literature) fish gonadotropin β subunits, with *Acipenser baeri* TSH β subunit as the outgroup. Only the nucleotide sequences were used, between the first and the last codon of the longest mature FSH β subunits (363 characters corresponding to 121 amino acids). For the

parsimony analysis, the gaps were treated as missing data and additional characters (insertion/deletion) were used to code for each codon or multiple consecutive codon deletions. The robustness of the inferred nodes was evaluated by using bootstrapping procedure over 1000 replicates. The relative evolution rate of FSH versus LH β subunit lineages was calculated from the computed consensus (majority rule) tree: LH branch lengths (cumulative assigned internode lengths from the basal lineage node to the terminal node using ACCTRAN character state optimization) were plotted against FSH branch lengths for each available couple (species for which both LH and FSH sequences were used in the data set), and the regression curve calculated using INSTAT software.

Southern blot analysis of genomic DNA

Genomic DNA was isolated from erythrocytes of mature male sea bass, using the protocol described by Martínez *et al.* (1998). A genomic DNA sample (1.7 μ g) was digested with the restriction enzymes PstI, BamHI or HindIII and electrophoresed on 0.8% agarose gels. The gels were processed as described by Sambrook *et al.* (1989), washed with 0.25N HCl, and treated with a denaturing solution (0.5M NaOH and 1.5M NaCl) and a neutralizing solution (0.5M Tris-HCl, 1.5M NaCl, and 1mM EDTA, pH 7.2). After transfer to Hybond- N⁺ nylon membranes, DNA was fixed for 2 h at 80 °C. The membranes were hybridized (50% formamide, 0.5% SDS, 10% dextran sulphate, 5x SSPE, and 5x Denhart's solution) overnight at 42 °C with [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol), with randomly labeled cDNA probes for sea bass α , FSH β , and LH β . Membranes were subjected to a four-step stringent washing cycle: 2x5 min with 1x SSC/0.1% SDS at room temperature, 30 min with 1x SSC/0.1% SDS at 65 °C, 3x30 min with 0.1x SSC/0.1% SDS at 65 °C, and 5 min with 1x SSC/0.1% SDS at room temperature, and exposed to X-ray films (Hyperfilm- MP, Amersham) at -80 °C.

Northern blot analysis

Pituitary and liver samples were collected from six mature male sea bass (body weight of around 2 kg) and total RNA extracted using the TRI Reagent. Prior to electrophoresis, pituitary and liver RNAs (13 µg) were denatured for 15 min at 65 °C, in 50% formamide and 6.5% formaldehyde. Electrophoresis was performed on 1.5% agarose gels in 0.02M MOPS buffer, pH 7.0, containing 6.5% formaldehyde, 8mM sodium acetate, and 1mM EDTA. Samples were transferred to Hybond- N⁺ membranes and fixed for 2 h at 80 °C. Specific cDNA probes for sea bass α , FSH β , and LH β subunits were randomly labeled with [α -³²P]dCTP at a 3000 Ci/mmol. Membranes were hybridized overnight at 42 °C with the corresponding radiolabeled probe, in a solution containing 50% formamide, 0.5% SDS, 10% dextran sulphate, 5x SSC, and 5x Denhart's solution. After hybridization, membranes were washed, as described in the Southern-blot section, and exposed to X-ray films (Hyperfilm-MP, Amersham) at -80 °C.

Northern-blot analysis was also used to test the specificity of the cDNA probes (data not shown). Three identical electrophoresis were prepared in parallel and loaded with, a sample of pituitary total RNA (lane 1) and the cloned full-length cDNAs of the sea bass α (lane 2), FSH β (lane 3), and LH β (lane 4) subunits. After electrophoresis, samples were transferred to nylon membranes and then each membrane was hybridized with one of the three probes, the α (membrane 1), the FSH β (membrane 2) or the LH β (membrane 3) probe. As expected, hybridization of membrane 1 with the α probe produced a positive hybridization band on lane 2 (α cDNA), but not on lanes 3 (FSH β cDNA) and 4 (LH β cDNA). Also, one positive band was detected by the α probe on lane 1 (pituitary RNA). Similarly, hybridization of membranes 2 and 3 with the FSH β and LH β probes, respectively, produced hybridization signals only on the lane corresponding to their respective cDNAs, but not with the other two subunit cDNAs. Also, the FSH β and LH β probes recognized single bands in the pituitary RNA sample but of different sizes, as corresponded to the different sizes of the α , FSH β , and LH β mRNA transcripts of the pituitary (see Northern-blot analysis in the Section 3).

Dot-blot analysis of GTH mRNA levels during the reproductive cycle

For this study, 3 years old male sea bass (BW, 635x30 g), maintained at the facilities of the Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, under natural conditions of photoperiod and temperature and fed a commercial diet (EWOS), were sacrificed at five critical periods of the reproductive period: early spermatogenesis (October 13th, n = 7), full-spermatogenesis (November 12th, n = 7), beginning of spermiation (December 28th, n = 7), full-spermiation (February 5th, n = 7), and postspermiation (April 18th, n = 7). Pituitaries were removed, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until analysis.

A dot-blot technique was set up for the measurement of α , FSH β , and LH β subunit mRNA levels. The dotblot assay was performed using the Bio-Dot apparatus from BioRad. Standard curves were prepared for the α , FSH β , and LH β subunit transcripts. A standard was also prepared to quantify 28s ribosomal RNA, to be used as internal control in the assay. The 28s rRNA probe is specific for sea bass and was previously obtained accidentally in our laboratory, by sequencing a PCR-amplified fragment isolated during the cloning process of sea bass NPY-related peptides (Cerdá-Reverter *et al.*, 2000).

From individual pituitaries, total RNA was extracted using the TRI Reagent. RNA pellets were dissolved in DEPC-treated water, quantified by its absorbance at 260/280 nm, and frozen at -80 °C before analysis. Before loading, RNA samples were denatured for 15 min at 65 °C, in 50% formamide and 6% formaldehyde. Samples (2, 5, and 5 μ g of pituitary RNA per well, for analysis of α , FSH β , and LH β , respectively) and standard curves (range from 50 to 0.78 pg/well) were dissolved on 10_ SSC and loaded onto Hybond-N⁺ nylon membranes. Nucleic acids were fixed at 80 °C for 2 h and membranes stored at room temperature for further hybridization with the radiolabeled probes. Specific cDNA probes for sea bass α , FSH β , LH β , and 28s rRNA were labeled with [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol). Membranes were pre-hybridized for 4 h at 42 °C and then hybridized overnight at 42 °C, in the same solution (50% formamide, 0.5% SDS, 10% dextran sulphate, 5x SSC, and 5x Denhart's solution), containing the corresponding

probe. Membranes were washed, as described in the Southern-blot section, and exposed to X-ray films (Hyperfilm-MP, Amersham) at -80 °C. The autoradiograms were scanned on a densitometer (model GS-670 from BioRad) and analyzed using the Molecular Analyst Image Analysis software from BioRad.

In the set-up of the technique, the specificity of the probes, previously tested by Northern-blot analysis (see Section 2.6), was tested by dot-blot (data not shown). Three identical dot-blot assays were run in parallel, which were loaded with, serial dilutions of pituitary total RNA (columns #1) and serial dilutions of the cloned full-length cDNAs of the sea bass α (columns #2), FSH β (columns #3), and LH β (columns #4) subunits. Each one of the three membranes was then hybridized with the GTH subunit probes, the α (membrane 1), the FSH β (membrane 2) or the LH β (membrane 3) probe. As expected, hybridization of membrane 1 with the α probe produced hybridization signal in the wells containing serial dilutions of pituitary RNA (column 1), as well as in the wells containing serial dilutions of the α transcript (column 2, standard curve α , but not in any of the wells containing serial dilutions of the FSH β transcript (column 3, standard curve FSH β or the LH β transcript (column 4, standard curve LH β . Similarly, hybridization of membranes 2 and 3 with the FSH β and LH β probes, respectively, produced hybridization signal in the wells containing serial dilutions of pituitary RNA (columns #1), as well as in the wells containing serial dilutions of the respective FSH β and LH β transcripts, but not in any of the wells containing serial dilutions of the other subunit transcripts.

Histology

Testicular samples were obtained from the fish described in the previous section, on each of the five sampling points. Samples were immersed, immediately after collection, on fixative solution (1% gluteraldehyde), embedded in glycol methacrylate plastic (Technovit 7100, Kulzer), sectioned at 3 μ m and stained with the Cleveland–Wolff technique (Herlant, 1960) for histological analysis. Identification and characterization of the different germ cell types was done according to Rodríguez *et al.* (2001).

Statistical analysis

All data are expressed as means±standard error of the mean (SEM). Differences between means were tested by multifactor analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey honestly significant differences (HSD) test. Previously, normality and homogeneity of variances were verified by the Kolmogorov–Smirnov test and Bartlett's test, respectively. In all cases, significance was accepted at $p < 0.05$.

Results

Molecular cloning of sea bass gonadotropin α subunit

Using sea bass pituitary cDNA as a template, one fragment of about 155 bp was PCR-amplified with primers based on the sequence of the gonadotropin α subunit from striped bass (Hassin *et al.*, 1995). This band hybridized with a full-length striped bass gonadotropin α subunit cDNA probe, which was kindly provided by Dr. Y. Zohar (Center of Marine Biotechnology, University of Maryland, Baltimore, MD). The specificity of the probe for the sea bass gonadotropin α subunit transcript, was further tested in our laboratory by Southern-blot analysis of sea bass genomic DNA (data not shown). Sequencing of the isolated 155 bp PCR-amplified fragment, showed highest homology with fish and mammalian GTH and TSH α subunits and also lower homology with vertebrate glycoprotein hormone β subunits, suggesting that it corresponded to the sea bass glycoprotein α subunit.

The purified cDNA fragment was used as a probe to screen a sea bass brain/pituitary cDNA library. One positive clone was identified, isolated, and sequenced. This clone was hybridized with the gonadotropin α probe and contained a cDNA insert of 625 bp. This cDNA had an open reading frame of 351 bp, starting with the first ATG codon at position 34 and ending with a stop TAG codon at position 385 bp (Fig. 1). The cleavage site for the signal sequence was inferred by comparison with data obtained from N-terminal sequencing of purified sea bass gonadotropin α subunit protein (unpublished data). When

a signal sequence of 23 amino acids was located, the proposed mature α subunit peptide of sea bass started with a tyrosine and consisted of 94 amino acids. Putative N-linked glycosylation sites were located at residues Asn55 and Asn80, from N-terminus of the predicted mature peptide.

As shown in Table 1, the sequence of the sea bass α subunit showed highest similarity (100%) with the closely related species striped bass (*M. saxatilis*), whereas similarity with other fishes ranged from 79 to 81% (Pleuronectiphorms) to 49% (Elasmobranches). Sequence similarities with the α subunit of higher vertebrates were 52–61% (Table 2). Sequence alignments indicated that the position of the 10 half cysteines and the two putative N-linked glycosylation sites were well conserved among all vertebrate α subunit sequences (Fig. 4).

Molecular cloning of sea bass gonadotropin β subunits

One fragment of 313 bp was PCR-amplified from sea bass pituitary cDNA, using degenerate primers based on alignments of fish FSH β cDNAs. This amplified fragment hybridized with a striped bass FSH β cDNA probe (kindly provided by Dr. Y. Zohar, Center of Marine Biotechnology, University of Maryland, Baltimore, MD). The specificity of the probe for the sea bass FSH β subunit transcript was further tested in our laboratory by Southern-blot analysis of sea bass genomic DNA (data not shown). The deduced amino acid sequence of this fragment showed homology to teleost FSH β sequences and thus, it was used as a FSH β probe to screen a sea bass brain/pituitary cDNA library. One clone was identified, isolated, and sequenced and showed to contain a cDNA insert of 521 bp. This cDNA had an open reading frame of 360 bp, starting with the first ATG codon at position 82 and ending with a stop TAA codon at position 442 bp (Fig. 2). The cleavage site for the signal sequence was inferred by comparison with the data (N-terminal tyrosine) obtained from N-terminal sequencing of the FSH β purified from other teleost species. When a signal sequence of 15 amino acids was located, the

proposed mature FSH β subunit peptide of sea bass started with a glycine and consisted of 105 amino acids, with a putative N-linked glycosylation site at residue Asn12.

Using degenerate primers based on alignments of fish LH β cDNAs, one fragment of 308 bp was amplified from sea bass pituitary cDNA. This amplified fragment hybridized with a striped bass LH β cDNA probe (kindly provided by Dr. Y. Zohar, Center of Marine Biotechnology, University of Maryland, Baltimore, MD). The specificity of the probe for the sea bass LH β subunit transcript was further tested in our laboratory by Southern-blot analysis of sea bass genomic DNA (data not shown). The deduced amino acid sequence of this fragment showed homology to fish LH β sequences. Screening a sea bass brain/pituitary cDNA library with this fragment as a probe, gave one positive clone that showed to contain a cDNA insert of 591. This cDNA had an open reading frame of 441 bp, starting with the first ATG codon at position 13 and ending with a stop TAG codon at position 454 bp (Fig. 3). The cleavage site for the signal sequence was inferred by comparison with the data (N-terminal tyrosine) obtained from N-terminal sequencing of the LH β subunit protein, purified from sea bass pituitaries (unpublished data). When a signal sequence of 32 amino acids was located, the proposed mature LH β subunit peptide of sea bass started with a Phe residue and consisted of 115 amino acids, with a putative N-linked glycosylation site at residue Asn10.

The amino acid and nucleic acid sequences of the sea bass β subunits showed highest similarities with closely related perciformes (Table 1). The number and position of half cysteine residues were conserved among all vertebrate FSH β and LH β sequences (except the first half cysteine of FSH β in the Japanese eel and *Rana ridibunda*), as well as the N-linked glycosylation sites (Fig. 4). The sea bass FSH β amino acid sequence was closer to vertebrate FSH β sequences than to LH β sequences (i.e., 35% to *Rattus* FSH β and 26% to *Rattus* LH β and similarly, the sea bass LH β sequence was more similar to vertebrate LH β 's (i.e., 40% to *Rattus* LH β and 26% to *Rattus* FSH β (Table 2).



Phylogenetic analysis

The inferred topologies obtained using distance matrix (ME-score=3.31) and parsimony methods (length=1421, consistency index: 0.48, homoplasy index: 0.52, retention index: 0.74) were very close (Fig. 5), only the relative positions of FSH within the Percomorphs varied from one method to another. The GTH β subunit sequences were divided into two groups, LH and FSH, supported by high bootstrap values, with Chondrosteian *Acipenser* sequences at the basis of each lineage. The teleostean LH and FSH β subunits were distributed into four groups in agreement with the accepted phylogenetic relationships between the corresponding species and groups: Elopomorphs (*Anguilla* sp.), Ostariophysis (Cyprinids and Siluridae), Salmonids (including *Coregonus*), and Percomorphs. As awaited from their close phylogenetic relationships, the sea bass sequences were clustered with the striped bass (*M. saxatilis*) sequences.

Relative evolution rate was estimated by plotting assigned branch lengths of LH versus those of FSH for the 14 species for which both sequences were in the data set (data not shown). It fitted a linear regression (FSH=1.295 \pm 0.021 LH; correlation index: 0.976) indicating that the FSH lineage evolves approximately 1.3 faster than the LH lineage for the considered species.

Southern blot and Northern blot analysis

Southern blot analysis of sea bass genomic DNA, for the α , FSH β , and LH β subunits, was performed over three parallel DNA samples, digested with the restriction enzymes PstI, BamHI, and HindIII. Hybridizations with the full-length α , FSH β , and LH β cDNA probes showed, for the products of each restriction enzyme, only one band in all cases (Fig. 6A).

Northern blot analysis of total RNA, extracted from sea bass pituitary, revealed single mRNA transcripts when hybridized with the α , FSH β or LH β cDNA probes, with sizes of about 730, 690, and 720 bases, respectively (Fig. 6B). No hybridization signals were detected over total RNA extracted from liver.

Changes in pituitary gonadotropin mRNA levels during the reproductive cycle

Adult male sea bass were sampled at five critical periods of the reproductive period. Fig. 7 shows histological sections of the four most representative stages of testicular development. In October, testicles initiated spermatogenesis and only spermatogonia A, a few cysts including other types of spermatogonia and a very small number of cysts containing primary spermatocytes were observed during this period (Fig. 7A). In November, the testicles were staged as in full-spermatogenesis and contained cysts with primary and secondary spermatocytes and spermatids (Fig. 7B). Full-spermiation was attained in February and at this stage spermatozoa were predominant. Nevertheless, other gamete stages, principally primary and secondary spermatocytes and spermatids, were also observed (Fig. 7C). Regressed testicles at post-spermiation were characterized by the presence of necrotic tissue with picnotic nucleus and residual sperm in the lobule lumen (Fig. 7D). In addition, a few spermatogonia A could also be observed.

The changes of steady-state mRNA pituitary levels of α , FSH β , and LH β subunits, together with changes in gonadal growth (gonadosomatic index, GSI) and LH protein concentration in the pituitary, were followed during the reproductive period. Gonadal growth increased from early spermatogenesis (GSI=0.162 \pm 0.02%) to full-spermiation (GSI=5.06 \pm 0.21%) (Fig. 8). In the pituitary, the concentration of the LH protein increased in parallel with the GSI, from 12x2 μ g of protein per gland at early spermatogenesis to a maximum of 50_5 μ g at full-spermiation, declining sharply at postspermiation (17_2 μ g/pit) (Fig. 8).

The changes of gonadotropin gene expression in the pituitary were analyzed by dot-blot during the reproductive cycle (Fig. 9). Determination of 28s rRNA in these analysis was used as internal control. We observed no changes in the levels of 28s rRNA from the samples of different sampling points, which indicates the appropriateness of using this transcript as internal control.

Analysis of α , FSH β , and LH β mRNA levels, showed that all gonadotropin subunit transcripts increased in parallel during reproduction and followed the profile of the GSI

and the accumulation of LH protein in the pituitary, increasing from early spermatogenesis to the full-spermiation period. At the end of the reproductive period (post-spermiation, GSI=0.42±0.1%), all subunit mRNA levels declined sharply and only expression of the α subunit was detectable, but not the FSH β and LH β subunits.

Discussion

This study describes the molecular cloning and sequence analysis of three gonadotropin subunits, α , FSH β , and LH β , in the European sea bass. Molecular characterization of the gonadotropin cDNAs allowed the development of a quantitative dot-blot technique and the investigation of changes in pituitary gonadotropin mRNA levels during the reproductive cycle of male sea bass.

The sequence of the sea bass α subunit, when compared with other vertebrates, showed that the position of all 10 cysteine residues and the two putative N-glycosylation sites are well conserved among species. It also appears that the region from amino acids 33 to 66 is highly conserved and consists of two paired adjacent cysteines and the first putative N-linked glycosylation site. This region is suggested to be involved, both in higher vertebrates (Xia *et al.*, 1994) and in fish (Gen *et al.*, 2000), in the processes of subunit assembly and/or receptor binding. Comparison of the deduced amino acid sequence of the sea bass α subunit with other fishes, showed high correlation between percentages of identity and phylogenetic relationships. Highest similarity (100%) was obtained with the closely related species striped bass (*M. saxatilis*). Similarities with other fish orders ranged from the highest 84–96% for Perciphorms, 79–80% for Pleuronectiphorms, around 70% for Cyprinids and Cyprinodontiphorms, and around 60% for other teleosts, with elasmobranchs sharing only 49% sequence identity.

Analysis of the sea bass FSH β and LH β amino acid sequences showed that the position of all 12 cysteines, which is related to the folding tendency of the protein and the rigid conformation of the GTH protein family, is well conserved. The position of putative N-linked glycosylation sites is also conserved among vertebrate β subunit sequences,

which corresponds to the important role of the sugar chains on the bioactivity of the GTHs, specifically on the stimulation of post-receptor binding functions upstream from G-protein activation and second messenger stimulation (Beitins and Padmanabhan, 1991). Glycosylation of the GTHs plays also important roles on the mechanisms of receptor coupling to adenylate cyclase (Arey *et al.*, 1997).

Comparison of the amino acid sequences of the sea bass GTH β subunits with those of other fish, showed higher similarities between LH β sequences than between FSH β sequences. Both sea bass FSH β and LH β were most similar to the respective *M. saxatilis* sequences (98%). Sequence identities for the FSH β sequences, ranged from around 70% for Perciphorms and Pleuronectiphorms, to around 40% for other teleosts, with 32% identity with Elasmobranches. For the LH β sequences, identities ranged from around 90% for Perciphorms, around 80% for Pleuronectiphorms, 60–70% for other teleosts, and 46% for Elasmobranches. Phylogenetic studies of vertebrate GTH sequences have indicated that the α subunit is most conserved during the molecular evolution of vertebrates, whereas the GTH β subunits have diverged more rapidly. As suggested by Qu erat and co-workers (Qu erat, 1994; Qu erat *et al.*, 2000), the fish's FSH β subunits have diverged more rapidly than LH β subunits during teleost evolution and are thus the most species specific.

When compared with higher vertebrates, the sea bass FSH β sequence was more similar to vertebrate FSH β than to LH β sequences (i.e., 35% to *Rattus* FSH β versus 26% to *Rattus* LH β and similarly, the sea bass LH β sequence was more similar to vertebrate LH β 's (i.e., 40% to *Rattus* LH β and 26% to *Rattus* FSH β). Previous phylogenetic studies have demonstrated that vertebrate GTH β subunits are separated in two monophyletic lineages, one grouping together fish and vertebrate FSHs and another lineage for fish LH together with other vertebrate LHs (Qu erat *et al.*, 2000). These studies support the similarity between fish FSH with tetrapod FSH and fish LH with tetrapod LH.

Analysis of sea bass genomic DNA indicated that the sea bass genome contained a single copy for the α , FSH β , and LH β subunits. Digestion of genomic DNA samples with restriction enzymes and further hybridization with α , FSH β , and LH β cDNA probes,

showed only one restriction fragment for each subunit. The indication that the sea bass gonadotropin subunits are encoded by single genes is also supported by Northern blot analysis, which showed the existence of single mRNA transcripts for α , FSH β , and LH β in the pituitary. In each case, the calculated transcript size of each subunit by Northern blot was longer than the size calculated from the respective cloned cDNA sequences, which could be attributed to the length of the poly(A)⁺ tail (Gen *et al.*, 2000). Altogether, these results indicate that the pituitary of sea bass express single copies of the α , FSH β , and LH β subunits, which are encoded by single genes. This is in agreement with other works on teleost fish (Gen *et al.*, 2000; Hassin *et al.*, 1995) and higher vertebrates (Fiddes and Goodman, 1981), which reported single genes for each GTH subunit. On another hand, it has been reported in several tetraploid fish species, such as some Chondostreans, Salmonids, and Cyprinids, that gonadotropin subunits might be encoded by two genes, in these species (Gen *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1992; Qu erat *et al.*, 2000; Sekine *et al.*, 1989; Yoshiura *et al.*, 1997).

The analysis of gonadotropin gene expression in the pituitary of male sea bass during the reproductive cycle showed that all three gonadotropin subunits increased in parallel during spermatogenesis, following the profile of the GSI increase. This suggests that all three subunits are required for the regulation of the processes of gametogenesis and gonadal maturation. The expression profile of the FSH β subunit showed its poor expression at the initiation of spermatogenesis, but mRNA levels increased continuously with the progression of gonadal growth and reached maximum levels at the initiation of the spermiation period. This profile of FSH β expression is similar to that described for other teleost fish, such as the Perciform *Pagrus major* (Gen *et al.*, 2000) or the Pleuronectiform *Paralichthys olivaceus* (Kajimura *et al.*, 2001), in which FSH β mRNA levels in the pituitary increase in correlation with the increment of the GSI, attaining maximum expression at the end of spermatogenesis. Available information in fish has suggested that the secretion of FSH from the pituitary would be a main regulator of the initiation and maintenance of spermatogenesis, mainly through stimulation of steroid synthesis in the testes (Borg, 1994; Melamed *et al.*, 1998). Previous works in male sea

bass, have shown that plasma profiles of the main androgens, testosterone and 11-ketotestosterone, correlates with gonadal growth, with low plasma concentrations at the beginning of spermatogenesis that increase during gametogenesis, to reach their peak levels with the initiation of the spawning period and declining thereafter (Prat *et al.*, 1990). These steroid secretion patterns would correlate with the observed profile of pituitary FSH β gene expression. It remains unknown if, in sea bass, the pattern of pituitary FSH β expression is correlated with secretion of FSH from the pituitary, because of the unavailability of FSH immunoassays for sea bass or other Perciphorm fish. Nevertheless, it has been shown in salmonid species, that increment of pituitary FSH β mRNA during spermatogenesis is correlated with secretion and elevation of plasma levels of FSH (Dickey and Swanson, 2000).

The peak levels of FSH β mRNA were attained at the beginning of spermiation, but they remained high during all the period of spermiation, declining to undetectable levels only after spermiation. Active transcription of the FSH β subunit during spermiation has been described in other perciform fishes, such as the red seabream (Gen *et al.*, 2000) and the goldfish (Yoshiura *et al.*, 1997). These results suggest that, at least in these species, the FSH hormone would also be important in the regulation of gamete final maturation and spermiation. Slightly different would be the situation in other fishes, i.e., Salmonids, in which pituitary FSH β expression is clearly predominant at spermatogenesis, during the early stages of gonadal development, declining during the period of spawning (Gómez *et al.*, 1999). It is also possible that active transcription of FSH β during the spermiation period might indicate the parallel maintenance of spermatogenesis in several batches of gametes present in the testes. In fact, the sea bass is a group-synchronous spawner and presents a rather long spawning season, in which females produce 2–4 individual spawns during the 1–2 months spawning period and males are actively spermiating during 3–5 months, with successive batches of spermatogenic growth and spermiation (Carrillo *et al.*, 1995). In the testes of male sea bass, groups of immature spermatozoa remain together with maturing or mature gametes and spermatogenesis occurs in the spawning season simultaneously with spermiation (Fig. 7C).

The expression levels of the LH β subunit follow a similar profile than those of the FSH β subunit, suggesting that, at least in sea bass, both the FSH and LH hormones are actively involved in the regulation of all processes of the reproductive cycle. The availability of LH immunoassays (Mañanós *et al.*, 2002) allowed to follow changes in LH protein levels and showed that accumulation of LH in the pituitary increase in parallel with the GSI and pituitary gene expression of the α and LH β subunits. Both LH protein and LH β mRNA levels increase gradually along spermatogenesis and show maximum levels during the period of full-spermiation. Similar results on LH gene expression and protein synthesis have been reported for other fish, such as rainbow trout (Gómez *et al.*, 1999), goldfish (Sohn *et al.*, 1999), tilapia (Melamed *et al.*, 2000), and striped bass (Hassin *et al.*, 1998), which reported that LH synthesis and release increase during gametogenesis and is maximum during late gametogenesis and spawning. All these works support the known role of LH as a main regulator of final gonadal maturation and ovulation/ spermiation (Swanson, 1991).

The gene expression of the α subunit follows similar changes than those of the FSH β and LH β subunits, increasing during gametogenesis to peak levels at full spermiation.

Although the expression of the α subunit gene could also correspond to the expression of the thyrotrophin hormone (TSH), which shares the common α subunit with the GTHs, it is likely that these reproductive fluctuations corresponded to the parallel expression of the GTH β subunits. Previous studies, using in situ hybridization techniques, have shown that during the reproductive cycle of rainbow trout, increments of α subunit mRNA levels are correlated with active transcription of the α subunit gene in the gonadotropic cells of the pituitary (Naito *et al.*, 1991). Nevertheless, we cannot rule out the possibility that thyrotrophs contribute to the observed increases in subunit mRNA levels. In fact, significant levels of α subunit mRNA were detected before spermatogenesis and after spawning, at a time when no GTH β expression was detectable.

In conclusion, this study demonstrated the existence in sea bass of two gonadotropins, FSH and LH, through the molecular cloning and sequence analysis of their three subunits, α , FSH β , and LH β . Studying changes in gene expression of the

gonadotropin subunits, we observed active transcription of all three subunits during the entire reproductive period of male sea bass and similar profiles for both β subunits, increasing during gametogenesis to maximal expression during the long period of active spermiation. Sequence analysis and phylogenetic studies of the sea bass GTH subunits, together with preliminary physiological data, supports the homology between fish and higher vertebrate gonadotropins.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Penny Swanson, from the NorthWest Fisheries Science Center (NOAA, Seattle, WA), for her valuable comments and discussions on the gonadotropic systems in fish. We are acknowledged to Dr. S. Hassin and Dr. Y. Zohar, from the Center of Marine Biotechnology (University of Maryland, Baltimore, MD), for their help and advice on the cloning of the sea bass gonadotropins. We acknowledge the Spanish Ministry of Education and Science for funding a fellowship to J. Mateos and the European Community for funding a Marie-Curie research grant (MCFI-1999-01335) to E. Mañanós. This work was financially supported by research projects funded by the European Community (FAIR CT97-3785) and by the Spanish Ministry of Education and Science (CICYT, MARI1998-1542-CE).

References

- Arey, B.J., Stevis, P.E., Deecher, D.C., Shen, E.S., Frail, D.E., Negro-Vilar, A., Lopez, F.J., 1997. Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol. Endocrinol.* 11, 517–526.
- Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Ramos, J., Kime, D.E., Carrillo, M., Zanuy, S., 2000. Hormonal regulation of the European sea bass reproductive cycle: and individualised female approach. *J. Fish. Biol.* 56, 1155–1172.

- Beitins, I.Z., Padmanabhan, V., 1991. Bioactivity of gonadotropins. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 20, 85–120.
- Bon, E., Breton, B., Govoroun, M.S., Le Menn, F., 1999. Effects of accelerated photoperiod regimes on the reproductive cycle of the female rainbow trout: seasonal variations of plasma gonadotropins (GTH I and GTH II) levels correlated with ovarian follicle growth and egg size. *Fish. Physiol Biochem.* 20, 143–154.
- Borg, B., 1994. Androgens in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 109, 219–245.
- 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 α stimulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111, 38–50.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Cerdá, J., Ramos, H., Mañanós, E., Bromage, N., 1995. Sea bass. In: Bromage, N.R., Roberts, J. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, London, pp. 138–168.
- Cerdá-Reverter, J.M., Martínez-Rodríguez, G., Zanuy, S., Carrillo, M., Larhammar, D., 2000. Molecular evolution of the neuropeptide Y (NPY) family of peptides: cloning of three NPY-related peptides from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Regul. Pept.* 95 (1–3), 25–34.
- Chang, Y.S., Huang, C.J., Huang, F.L., Liu, C.S., Lo, T.B., 1990. Purification, characterization, and molecular cloning of gonadotropin subunits of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 78, 23–33.
- Combarnous, Y., 1992. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocrinol. Rev.* 13, 670–691.
- Dickey, J.T., Swanson, P., 2000. Effects of salmon gonadotropin releasing hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 118, 436–449.
- Elizur, A., Meiri, I., Rosenfeld, H., Zmora, N., Knibb, W.R., Zohar, Y., 1995. Seabream gonadotropins: sexual dimorphism in gene expression. In: Goetz, F.W., Thomas, P. (Eds.), *Proceedings of the Fifth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. University of Austin: Fish Symposium 13–15.

- Elizur, A., Zmora, N., Rosenfeld, H., Meiri, I., Hassin, S., Gordin, H., Zohar, Y., 1996. Gonadotropins β -GtHI and β -GtHII from the gilthead seabream, *Sparus aurata*. Gen. Comp. Endocrinol. 102, 39–46.
- Fiddes, J.C., Goodman, H.M., 1981. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. J. Mol. Appl. Genet. 1, 3–18.
- Gen, K., Maruyama, O., Kato, T., Tomizawa, K., Wakabayashi, K., Kato, Y., 1993. Molecular cloning of cDNAs encoding two types of gonadotrophin α subunit from the masu salmon, *Oncorhynchus masou*: construction of specific oligonucleotides for the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits. J. Mol. Endocrinol. 11, 265–273.
- Gen, K., Okuzawa, K., Senthilkumaran, B., Tanaka, H., Moriyama, 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.
- 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, 413–428.
- Hassin, S., Elizur, A., Zohar, Y., 1995. Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotropin- I and -II subunits. J. Mol. Endocrinol. 15, 23–35.
- Hassin, S., Gothilf, Y., Blaise, O., Zohar, Y., 1998. Gonadotropin-I and -II subunit gene expression of male striped bass (*Morone saxatilis*) after gonadotropin-releasing hormone analogue injection: quantitation using an optimised ribonuclease protection assay. Biol. Reprod. 58, 1233–1240.
- Hearn, M.T.W., Gomme, P.T., 2000. Molecular architecture and biorecognition processes of the cysteine knot protein superfamily: part I. The glycoprotein hormones. J. Mol. Recognit. 13, 223–278.
- Herlant, M., 1960. Etude critique de deux techniques nouvelles a .n de mettre en evidence les diferentes categories cellulaires presente dans la glande pituitarire. Bull. Micros. Appl. 10, 37–44.

- Huang, C.J., Huang, F.L., Wang, Y.C., Chang, Y.S., Lo, T.B., 1992. Organization and nucleotide sequence of carp gonadotropin alpha subunit genes. *Biochem. Biophys. Acta* 1129, 239–242.
- Jackson, K., Goldberg, D., O.r, M., Abraham, M., Degani, G., 1999. Blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) gonadotropic beta subunits (I and II) cDNA sequences and expression during oogenesis. *J. Mol. Endocrinol.* 23, 177–187.
- Kajimura, S., Yoshiura, Y., Suzuki, M., Aida, K., 2001. cDNA cloning of two gonadotropin beta subunits (GTH-I β and -II β) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 122, 117–129.
- Kato, Y., Gen, K., Maruyama, O., Tomizawa, K., Kato, T., 1993. Molecular cloning of cDNAs encoding two gonadotrophin beta subunits (GTH-I β and -II β) from the masu salmon, *Oncorhynchus masou*: rapid divergence of the GTH-I β gene. *J. Mol. Endocrinol.* 11, 275–282.
- Kawauchi, H., Suzuki, K., Itoh, H., Swanson, P., Naito, N., Nagahama, Y., Nomki, M., Nakai, Y., Itoh, S., 1989. The duality of teleost gonadotropins. *Fish. Physiol. Biochem.* 7, 29–38.
- Kobayashi, M., Kato, Y., Yoshiura, Y., Aida, K., 1997. Molecular cloning of cDNA encoding two types of pituitary gonadotropin alpha subunit from the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105, 372–378.
- Laphorn, A.J., Harris, D.C., Littlejohn, A., Lustbader, J.W., Can.eld, R.E., Machin, K.J., Morgan, F.J., Isaacs, N.W., 1994. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 369, 455–461.
- Mañanós, E., Zanuy, S., Carrillo, M., 1997. Photoperiodic manipulations of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development and plasma 17 β -estradiol and vitellogenin. *Fish Physiol. Biochem.* 16, 211–222.
- Mañanós, E., Carrillo, M., Sorbera, L.A., Mylonas, C.C., Asturiano, J.F., Bayarri, M.J., Zohar, Y., Zanuy, S., 2002. Luteinizing hormone (LH) and sexual steroid plasma

- levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa). *J. Fish. Biol.* 60, 328–339.
- Martínez, G., Shaw, E.M., Carrillo, M., Zanuy, S., 1998. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *BioTechniques* 24, 238–239.
- Mateos, J., Mañanós, E., Carrillo, M., Zanuy, S., 2002. Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean sea bass. *Comp. Biochem. Physiol. B* 132, 75–86.
- Melamed, P., Gur, G., Rosenfeld, H., Elizur, A., Schulz, R.W., Yaron, Z., 2000. Reproductive development of male and female tilapia hybrids (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) and changes in mRNA levels of gonadotropin (GtH) I β and II β subunits. *J. Exp. Zool.* 286, 64–75.
- Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., Yaron, Z., 1998. Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 119, 325–338.
- Naito, N., Hyodo, S., Okumoto, N., Urano, A., Nakai, Y., 1991. Differential production and regulation of gonadotropins (GTH I and GTH II) in the pituitary gland of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during ovarian development. *Cell Tissue Res.* 266, 457–467.
- Navas, J.M., Mañanós, E., Thrush, M., Ramos, J., Zanuy, S., Carrillo, M., Zohar, Y., Bromage, N., 1998. Effect of dietary lipid composition on vitellogenin, 17 β -estradiol and gonadotropin plasma levels and spawning performance in captive sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 165, 65–79.
- Pierce, J.G., Parsons, T.F., 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 465–495.
- Prat, F., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 1996. Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropin (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout

Artículo 1

- the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biol. Reprod. 54, 1375–1382.
- Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M., de Mones, A., Fostier, A., 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. Gen. Comp. Endocrinol. 78, 361–373.
- Quérat, B., 1994. Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates. In: Davey, K.G., Peter, R.E., Tobe, S.S. (Eds.), Perspectives in Comparative Endocrinology. National Research Council of Canada, pp. 27–35.
- Quérat, B., 1995. Structural relationships between Fish and Tetrapod gonadotropins. In: Goetz, F.W., Thomas, P. (Eds), Reproductive Physiology of Fish. FishSymp95, Austin, pp. 7–9.
- Quérat, B., Sellouk, A., Salmon, C., 2000. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) β subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. Biol. Reprod. 63, 222–228.
- Quérat, B., Tonnerre-Doncarli, C., Genies, F., Salmon, C., 2001. Duality of gonadotropins in gnathostomes. Gen. Comp. Endocrinol. 124, 308–314.
- Rodríguez, L., Zanuy, S., Carrillo, M., 2001. Influence of daylength on the age at first maturity and somatic growth in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). Aquaculture 196, 159–175.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Analysis of genomic DNA by Southern hybridization. In: Nolan, C., Ferguson, M. (Eds.), Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 9.31–9.59.
- Schulz, R.W., Bogerd, J., Bosma, P.T., Peute, J., Rebers, F.E.M., Zandbergen, M.A., Goos, H.J., 2001a. Physiological, morphological, and molecular aspects of gonadotropins in fish with special reference to the African catfish, *Clarias gariepinus*. In: Goetz, F.W., Thomas, P. (Eds), Reproductive Physiology of Fish. FishSymp95, Austin, pp. 2–6.

- Schulz, R.W., Vischer, H.F., Cavaco, J.E., Santos, E.M., Tyler, C.R., H.J., Bogerd, J., 2001b. receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B* 129, 407–417.
- Sekine, S., Saito, A., Itoh, H., Kawauchi, H., Itoh, S., 1989. Molecular cloning and sequence analysis of chum salmon gonadotropin cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8645–8649.
- Slater, C.H., Schreck, C.B., Swanson, P., 1994. Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 109, 167–175.
- 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.
- 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. In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.M., Rolfe, M.S. (Eds.), *Reproductive Physiology of Fish. FishSymp91*. University of East Anglia, UK, pp. 2–7.
- Trudeau, V.L., 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotropin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev. Reprod.* 2, 55–68.
- Weil, C., Bougoussa-Houadec, M., Gallais, C., Itoh, S., Sekine, S., Valotaire, Y., 1995. Preliminary evidence suggesting variations of GtH 1 and GtH 2 mRNA levels at different stages of gonadal development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 100, 327–333.
- Xia, H., Chen, F., Puett, D., 1994. A region in the human glycoprotein hormone α -subunit important in holoprotein formation and receptor binding. *Endocrinology* 134, 1768–1770.

- Yoshiura, Y., Kobayashi, M., Kato, Y., Aida, K., 1997. Molecular cloning of the cDNAs encoding two gonadotropin beta subunits (GTH-I β and -II β) from the goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol. 105, 379–389.
- Zohar, Y., Billard, R., Weil, C., 1984. La reproduction de la daurade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*): connaissance du cycle sexuel et contrôle de la gamétogenèse et de la ponte. In: Barnabé, G., Billard, R. (Eds.), L'Aquaculture du bar et des Sparidés. INRA Publications, Versailles, pp. 3–24.

Table 1

Sequence identity between sea bass gonadotropin subunits and other fish subunits, at the nucleic acid and amino acid level

	Nucleotide			Amino acid			NCBI Accession No.		
	α	FSH β	LH β	α	FSH β	LH β	α	FSH β	LH β
<i>O. Perciformes</i>									
<i>M. saxatilis</i>	96	95	97	100	98	98	MOZGONAA	MOZGONAIB	MOZGONAIIB
<i>P. major</i>	91	80	83	96	70	90	AB028211	AB028212	AB028213
<i>Acanthopagrus latus</i>	88	—	85	91	—	90	AANGONA		AANGBS
<i>S. aurata</i>	88	81	84	90	76	90	AF300425	Elizur et al., 1996	Elizur et al., 1996
<i>Trichogaster trichopterus</i>	—	80	82	—	71	89		AF157630	AF157631
<i>Orochromis mossambicus</i>	81	72	—	84	53	—	AF303087	AF289174	
<i>O. Pleuronectiformes</i>									
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	82	81	71	81	66	85	AHA417770	AHA417768	AHA417769
<i>P. olivaceus</i>	83	79	76	79	75	82	AF268692	AF268693	AF268694
<i>O. Cyprinodontiformes</i>									
<i>Fundulus heteroclitus</i>	78	64	75	73	56	72	FHU12923	FUNGTHI	FUNGTHII
<i>O. Cypriniformes</i>									
<i>Carassius auratus</i>	67/63	58	65	64/66	42	68	D86551/D86552	D88023	D88024
<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	55	—	61	66	—	67	CIGONADA		CIGONADB
<i>Cyprinus carpio</i>	62/52	55	52	66/66	43	66	CYIGTHALV-AII	AB003583	X59889
<i>Mylropharyngodon piceus</i>	—	57	57	—	40	66		AF319961	AF319960
<i>O. Sauriformes</i>									
<i>Ictalurus punctatus</i>	52	57	59	62	46	63	AF112190	AF112191	AF112192
<i>Clarias gariepinus</i>	50	—	53	65	—	63	CGGPHA		CGGTHBETA
<i>O. Clupeiformes</i>									
<i>Choca harengus</i>	—	—	58	—	—	64			CHGTHIIB
<i>O. Salmoniformes</i>									
<i>Coegonus autumnalis</i>	—	56	63	—	40	64		CGOGTRPNI	CGOGTPNII
<i>Onorhynchus keta</i>	66	54	58	62	40	66	E01776	ONHGTHIB	ONHGTHIIB
<i>Onorhynchus masou</i>	66/67	56	67	59/62	40	65	S69273/-274	S69275	S69276
<i>Onorhynchus mykiss</i>	56	57	60	62	40	65	AB050834	AB050835	AB050836
<i>Onorhynchus tshawytscha</i>	54	—	60	62	—	63	S77059		OTGTHBR
<i>Salmo salar</i>	—	56	76	—	39	69		AF146152	AF146151
<i>O. Anguilliformes</i>									
<i>Anguilla anguilla</i>	52	—	62	59	—	60	AAGHA		AAGOIIB
<i>Anguilla japonica</i>	—	49	56	—	42	60		AB016169	AY082379
<i>Conger myriaster</i>	—	54	56	—	44	58		AB045157	AB045158
<i>O. Aipenseriformes</i>									
<i>A. xeri</i>	47	41	50	60	35	51	ABA310342	AST251658	AST251656
<i>C. Elasmobranches</i>									
<i>Scliorhinus canicula</i>	51	38	51	49	32	46	SCA310343	SCA310344	SCA310345
<i>D. abrax α</i>	—	40	32	—	16	15			
<i>D. abrax FSHβ</i>	—	—	42	—	—	27			

NCBI database accession number of the sequences is given on the right columns.

Table 2
Amino acid identity between sea bass gonadotropin subunits and those of representatives from higher vertebrates

	Sea bass		
	α	FSH β	LH β
α			
Mammals	61	12	16
Birds	58	11	14
Reptiles	58	13	14
Amphibians	52	16	18
FSH β			
Mammals	12	35	26
Birds	16	37	37
Reptiles	19	35	37
Amphibians	16	36	41
LH β			
Mammals	13	26	40
Birds	13	30	46
Reptiles	20	30	53
Amphibians	19	30	51

NCBI accession number of the sequences are: mammals (*Rattus norvegicus*) α RATPGHA, FSH β RATFSHBS, LH β NM_012858; birds (*Coturnix japonica*) α S70833, FSH β AB086952, LH β S70834; reptiles (*Chinemys reevesii*) α AB085199, FSH β AB085201, LH AB085202; amphibians (*Xenopus laevis*) α XELTSHA, FSH β (*Buffo japonicus*) AB085668, LH β (*Buffo japonicus*) AB085666.

```

1   ctttctctcaacatggtaactgctgcaaccacg ATG GGC TCA GTG AAA TCA  51
-23                               Met Gly Ser Val Lys Ser -18

52  GCT GTA CTG TCT GTT CTT CTG TTG TCT TTT ATT CTT TAC GTA GTT  96
-17 Ala Val Leu Ser Val Leu Leu Leu Ser Phe Ile Leu Tyr Val Val -3

97  GAT TCT TAC CCC AGC ATG GAC TTA TCA AAC ATG GGC TGT GAG GAG 141
-2  Asp Ser Tyr Pro Ser Met Asp Leu Ser Asn Met Gly Cys Glu Glu  13

142 TGC ACA CTG AGA AAG AAC AGT GTT TTC TCC AGG GAT CGT CCG GTC 186
14  Cys Thr Leu Arg Lys Asn Ser Val Phe Ser Arg Asp Arg Pro Val  28

137 TAT CAG TGC ATG GGC TGC TGC TTC TCC AGA GCG TAC CCA ACT CCT 231
29  Tyr Gln Cys Met Gly Cys Cys Phe Ser Arg Ala Tyr Pro Thr Pro  43

232 CTC AAG CCC ATG AAG ACC ATG ACC ATC CCG AAG AAC ATC ACC TCC 276
44  Leu Lys Ala Met Lys Thr Met Thr Ile Pro Lys Asn Ile Thr Ser  58

277 CAG GCC ACA TCC TGT CTC GCA AAG CAC ACC TAC CAG ACA GAG GTC 321
59  Glu Ala Thr Cys Cys Val Ala Lys His Ser Tyr Glu Thr Glu Val  73

322 GCC GGC ATA AAG GTG CGA AAC CAC ACA GAC TGC CAC TGC AGC ACC 366
74  Ala Gly Ile Lys Val Arg Asn His Thr Asp Cys His Cys Ser Thr  88

367 TGC TAT TTT CAT AAG ATA TGA cagatgggaactggagaccattctgcagecc 418
89  Cys Tyr Phe His Lys Ile stop                               95

419 tcagcttagcaacaaattgtgctctcttttaatatgeatgagctctctctctttttaaagt 477
473 tattttcttgtgttgcagataatattttttagcaattctgtgctctgtgatgtgtaat 532
533 tagcctacattctggcattgatagagatgtgtgattaattgtagattgaaaagcaatta 595
596 aaatgtgcaccagatgttgcactttcatg(polyA)                       625

```

Fig. 1.

Nucleotide and deduced amino acid sequences of the sea bass gonadotropin α subunit. The first amino acid of the putative mature peptide is underlined and numbered as +1 and amino acids of the signal peptide are given negative numbers. Putative N-linked glycosylation sites, at Asn residues 55 and 80, are shown in bold. Ten highly conserved Cys residues are localized at positions 11-14-31-34-35-62-63-84-86-89. A putative polyadenylation signal ATTAAA was recognized 29 bp upstream from the poly(A) tail. This sequence has been deposited in the GenBank nucleotide database, under Accession No. AF260157.

```

1  gtttagagattgacagaagaagcaagggtcaaaagcaacagcagagatcgatagtagt  58
59  gtctgtgctgcacccagcagagg ATG CAG CTA GTT GTC ATG GTA GCA GTG 108
-15                               Met Gln Leu Val Val Met Val Ala Val  -7

109 CTG GCA CTG GCG CCG GCG GGG CAG GGC TGC AGC TTC GGC TGT CAT 153
-6  Leu Ala Leu Ala Arg Ala Gly Gln Gly Cys Gly Cys Ser Phe His  9

154 CCC ACC AAC ATC AGC ATC CAA GTG GAG AGT TGT GGC CTC ACC GAG 198
10  Pro Thr Asn Ile Ser Ile Gln Val Glu Ser Cys Gly Leu Thr Glu  24

199 GTC ATC TAC ACC ACC ATA TGT GAA GGA CAG TGC TAC CAC GAG GAT 243
25  Val Ile Tyr Thr Thr Ile Cys Glu Gly Gln Cys Tyr His Glu Asp  39

244 CTG GTC TAC CTC AGC CAC TAT GAG AGG CCT GAA CAG AGA ATC TGT 288
40  Leu Val Tyr Leu Ser His Tyr Glu Arg Pro Glu Gln Arg Ile Cys  54

289 AAC GGA GAC TGG TCC TAT GAG GTG AAA CAC ATT AAA GGT TGT CCA 333
55  Asn Gly Asp Trp Ser Tyr Glu Val Lys His Ile Lys Gly Cys Pro  69

334 GTG GGT GTC ACC TAC CCT GTG GCC AGA AAC TGC GAG TGT ACC ACT 378
70  Val Gly Val Thr Tyr Pro Val Ala Arg Asn Cys Glu Cys Thr Thr  84

379 TGT AAC ACA GAA AAC ACA CAC TCC CCG CCG TTT CCT GGA GAC ATA 423
85  Cys Asn Thr Glu Asn Thr Asp Cys Gly Arg Phe Pro Gly Asp Ile  99

424 CCC AGC TGT CTG TCC TTT TAA agaaacctgtcatctatcctacattagttat 475
100 Pro Ser Cys Leu Ser Phe stop 106

476 tatgtgtgtgcacttgacttggtactaaaataaacaggtatcactt (polyA) 521

```

Fig. 2.

Nucleotide and deduced amino acid sequences of the sea bass FSH β subunit. The first amino acid of the putative mature peptide is underlined and numbered as +1, while amino acids of the signal peptide are given negative numbers. A putative N-linked glycosylation site, at Asn residue 12, is shown in bold. Twelve highly conserved Cys residues are localized at positions 4-6-20-31-35-54-68-80-82-85-92-102. A putative polyadenylation signal AATAAA was recognized 13 bp upstream from the poly(A) tail. This sequence has been deposited in the GenBank nucleotide database, under Accession No. AF543314.

1	ccagagaggatg	ATG GCT GTG CAG GCC AGC AGA GTG ATG TTC CCC	45
-32		Met Ala Val Gln Ala Ser Arg Val Met Phe Pro	-22
46	TTG GTG TTG AGT TTG TTT CTG GGA GCC ACA TCT TCC ATT TGG CCC	90	
-21	Leu Val Leu Ser Leu Phe Leu Gly Ala Thr Ser Ser Ile Trp Pro	-7	
91	CTG GCC ACT CCA GAG GCC TTC CAG CTG CCG CCC TGC CAG CTC ATC	135	
-6	Leu Ala Thr Ala Glu Ala <u>Phe</u> Gln Leu Pro Pro Cys Gln Leu Ile	9	
136	AAC CAG ACA CTG TCT CTA GAA AAG GAG GGT TGT CCC AAG TGT CAC	180	
10	Asn Gln Thr Val Ser Leu Glu Lys Glu Gly Cys Pro Lys Cys His	24	
181	CCA GTG GAA ACA ACA ATC TGT AGT GGT CAC TGC ATC ACT AAG GAC	225	
25	Pro Val Glu Thr Thr Ile Cys Ser Gly His Cys Ile Thr Lys Asp	39	
226	CCT GTC ATT AAG ATA CCA TTC AGC AAT GTT TAT CAG CAT GTG TGC	270	
40	Pro Val Ile Lys Ile Pro Phe Ser Asn Val Tyr Gln His Val Cys	54	
271	ACG TAC CGG AAC TCA CAC TAC AAG ACA TTT GAG CTT CCT GAC TGT	315	
55	Thr Tyr Arg Asn Ser His Tyr Lys Thr Phe Glu Leu Pro Asp Cys	69	
316	CCA CCT GGT GTG GAC CCA ACC GTC ACC TAC CCC GTG GCT CAG AGC	360	
70	Pro Pro Gly Val Asp Pro Thr Val Thr Tyr Pro Val Ala Gln Ser	84	
361	TGC CAC TGC CGC CGC TGT GCC ATG GAC ACG TCT GAC TGT ACC TTC	405	
85	Cys His Cys Gly Arg Cys Ala Met Asp Thr Ser Asp Cys Thr Phe	99	
406	GAG AGC CTC CAG CCC AAC TTC TGC ATG AAT GAC ATA CCT TTC TAC	450	
100	Glu Ser Leu Gln Pro Asn Phe Cys Met Asn Asp Ile Pro Phe Tyr	114	
451	TAC TAG tctcaatagcagcatgaagcaccatgctaaaactgtgcttactttcagcatca	507	
115	Tyr stop	116	
508	actggtgtaaggactgtcacattttaccactgcaaaaaaattttctttgtttctatttct	566	
567	ctgtgcaataaaaataccacattg (polyA)	591	

Fig. 3.

Nucleotide and deduced amino acid sequences of the sea bass LH β subunit. The first amino acid of the putative mature peptide is underlined and numbered as +1, while amino acids of the signal peptide are given negative numbers. A putative N-linked glycosylation, at Asn residue 10, is shown in bold. Twelve highly conserved Cys residues are localized at positions 6-20-23-31-35-54-69-85-87-90-97-107. A putative polyadenylation signal AATAAA was recognized 13 bp upstream from the poly(A) tail. This sequence has been deposited in the GenBank nucleotide database, under Accession No. AF543315.



α

Sequence alignment for α subunit. Species: Dicentrarchus labrax, Morone saxatilis, Pagrus major, Fundulus heteroclitus, Oncorhynchus keta, Carassius auratus, Ictalurus punctatus, Anguilla anguilla, Acipenser baeri, Xenopus laevis, Chinemys reevesii, Coturnix japonica, Rattus norvegicus. Amino acid positions 1, 2, 3, 45, 67, 8, 9, 10 are marked with asterisks. Gaps are indicated by dots.

FSHβ

Sequence alignment for FSHβ subunit. Species: Dicentrarchus labrax, Morone saxatilis, Pagrus major, Sparus aurata, Trichogaster trichopterus, Fundulus heteroclitus, Oncorhynchus keta, Carassius auratus, Ictalurus punctatus, Anguilla japonica, Acipenser baeri, Rana ridibunda, Chinemys reevesii, Coturnix japonica, Rattus norvegicus. Amino acid positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 are marked with asterisks. Gaps are indicated by dots.

LHβ

Sequence alignment for LHβ subunit. Species: Dicentrarchus labrax, Morone saxatilis, Pagrus major, Sparus aurata, Trichogaster trichopterus, Fundulus heteroclitus, Oncorhynchus keta, Carassius auratus, Ictalurus punctatus, Anguilla japonica, Acipenser baeri, Bufo japonicus, Chinemys reevesii, Coturnix japonica, Rattus norvegicus. Amino acid positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 are marked with asterisks. Gaps are indicated by dots.

Fig. 4.

Alignment of the amino acid sequence of the sea bass gonadotropin subunits with those of other fishes (Perciphorms: *M. saxatilis*, *P. major*, *S. aurata*, *Trichogaster trichopterus*; Cyprinodontiphorms: *Fundulus heteroclitus*; Salmonids: *Oncorhynchus keta*; Cyprinids: *Carassius auratus*; Siluriphorms: *Ictalurus punctatus*; Anguilliphorms: *Anguilla anguilla* or *Anguilla japonica*; Acipenseriphorms: *A. baeri*) and higher vertebrates (Amphibia: *Xenopus laevis*, *Rana ridibunda* or *Bufo japonicus*; Reptiles: *Chinemys reevesii*; Birds: *Coturnix japonica*; Mammals: *R. norvegicus*). For each subunit, only the amino acid positions that differed from that of the sea bass sequence (upper) are given, the identical position being indicated by a dot. Gaps (shown by

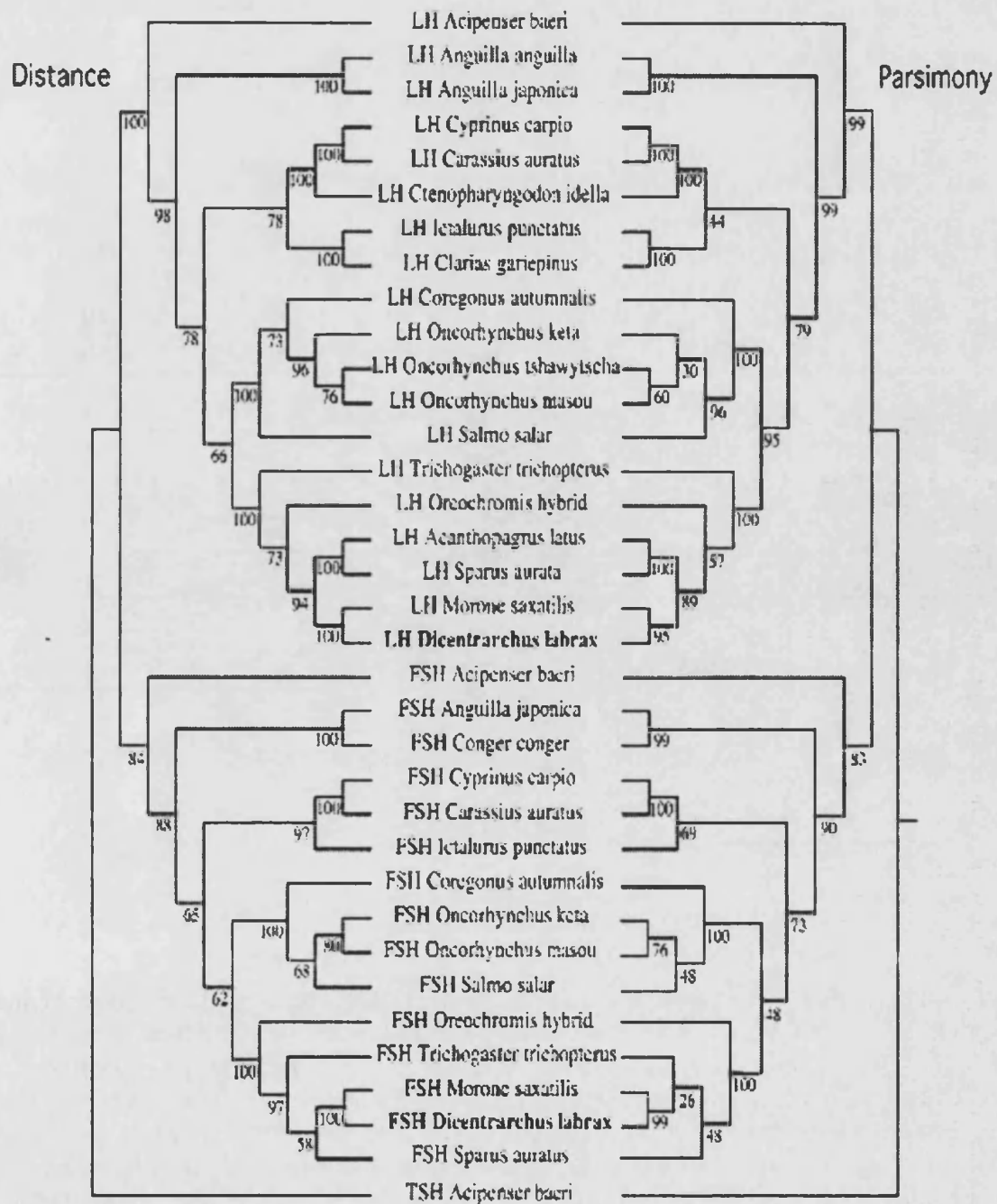


Fig. 5.

Phylogenetic trees (50% majority rule cladograms) of fish gonadotropin β subunit nucleotide sequences, inferred from Neighbour-joining (distance) or full heuristic search (parsimony) methods. The thyrotropin β subunit sequence from *Acipenser baeri* was used as the outgroup. Bootstrap values (in %) from 1000 replicates are indicated for each node.

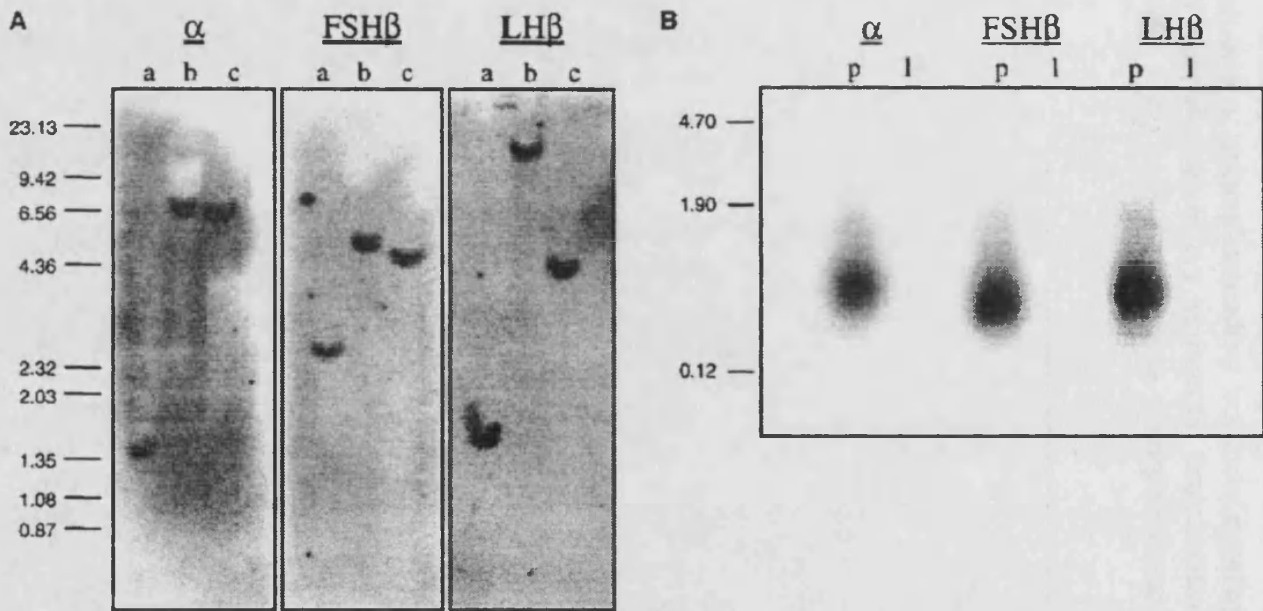


Fig. 6.

(A) Southern blot analysis of sea bass genomic DNA, prepared from blood of male fish. Parallel DNA samples (1.7 μ g each) were digested with the restriction enzymes PstI (a), BamHI (b) or HindIII (c) and electrophoresed on 0.8% agarose gels. Position of DNA molecular markers is given on the left in kbp. (B) Northern blot analysis of sea bass total RNA, prepared from pituitary (p) or liver (l). The RNA samples (13 μ g per well) were fractionated on denaturing 1.5% agarose gels. After electrophoresis, nucleic acids were transferred to nylon membranes and hybridized with [α - 32 P]dCTP-labeled α , FSH β , and LH β cDNA probes. Position of RNA molecular markers is given on the left in kb.

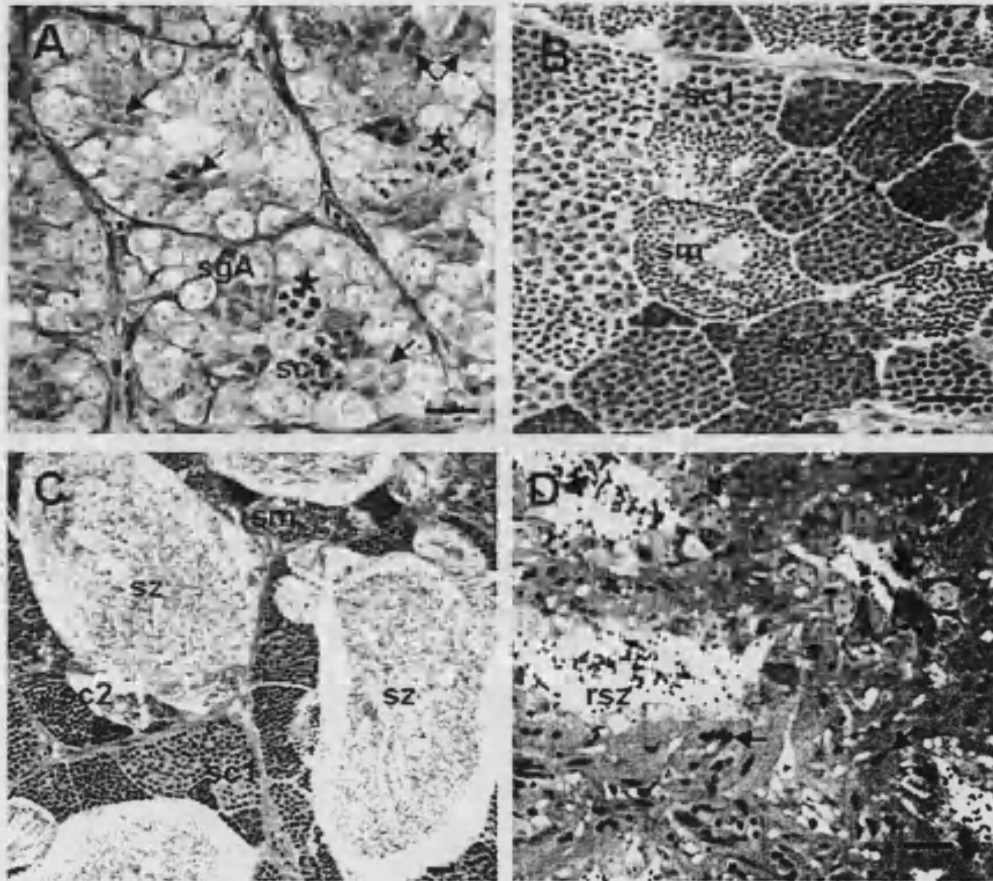


Fig. 7.

Testicular sections corresponding to the four representative periods of gonadal development during the reproductive cycle of male sea bass. (A) Early spermatogenesis, lobules contain spermatogonia A (sgA), cysts with other types of spermatogonia (arrows), few cysts with primary spermatocytes (sc1), and mitotic figures (stars); (B) full-spermatogenesis, lobules contain cysts with primary (sc1) and secondary (sc2) spermatocytes, and spermatids (sm); (C) full-spermiation, lobules contain all stages of spermatogenesis, but spermatozoa (sz) are predominant; (D) post-spermiation stage or regressed testes, showing abundant necrotic tissue with picnotic nucleus (arrows) and residual sperm (rsz). Bars, 20 μ m.

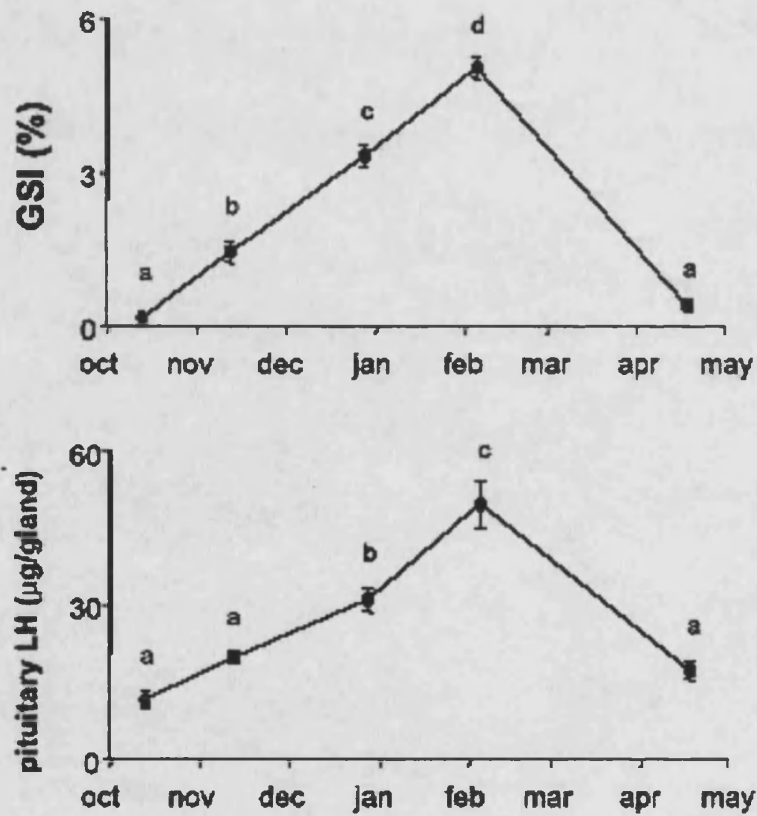


Fig. 8.

Changes in the gonadosomatic index (GSI) and the concentration of LH in the pituitary, during the reproductive period of male sea bass. Samples were taken at five critical developmental stages: early spermatogenesis (October 13th), full-spermatogenesis (November 12th), beginning of spermiation (December 28th), full-spermiation (February 5th), and post-spermiation (April 18th). Data are means±SEM ($n=7$).

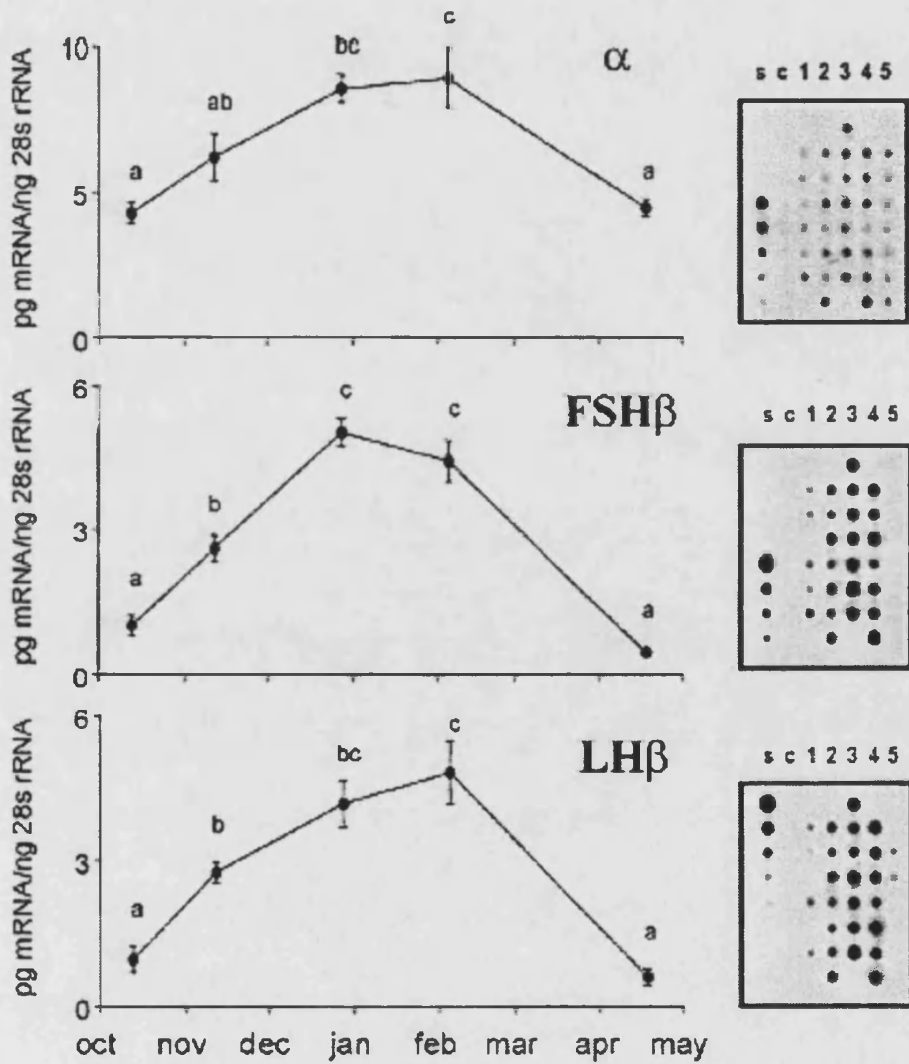


Fig. 9.

Changes in α , FSH β , and LH β mRNA levels in the pituitary, during the reproductive period of male sea bass. Samples were taken at five critical developmental stages: early spermatogenesis (October 13th), full-spermatogenesis (November 12th), beginning of spermiation (December 28th), full-spermiation (February 5th), and post-spermiation (April 18th). Data are means \pm SEM ($n=7$). Photographs correspond to the dot-blotted X-ray films, containing the standard curve for each subunit (s; ranging from 0.78 to 12.5 μ g per well, except for FSH β which goes up to 6.25), the negative controls (c; loaded with 5 μ g per well of brain and liver RNA), and the individual RNA samples (1-Oct, 2-Nov, 3-Dec, 4-Feb, and 5-Apr).

Purification of luteinizing hormone (LH) in the sea bass
(*Dicentrarchus labrax*) and development of a specific immunoassay
(ELISA)

Jorge Mateos, Evaristo Mañanós *, Manuel Carrillo and Silvia Zanuy

*Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (C.S.I.C.), Ribera de Cabanes s/n,
12595-Torre la Sal (Castellón), Spain.*

Abstract

This study describes the purification of luteinizing hormone (LH) from pituitaries of sea bass (*Dicentrarchus labrax*), by ethanol extraction and a three-step chromatographic protocol, including gel filtration on Superdex-G100, ion-exchange on DEAE-Sepharose and gel filtration on Superdex-75. The LH subunits, α and β , were further isolated by rpHPLC. On SDS-PAGE, the estimated molecular weight for LH was 31 kD and for the LH- α and LH- β subunits were 12 and 22 kD, respectively. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed, using specific antibodies for sea bass LH- β subunit. The ELISA had a sensitivity of around 0.65 ng/ml (Bi/Bo 80%) and intra- and inter-assay coefficients of variation of 11.7% (n=8) and 11% (n=10), respectively. In the ELISA, the LH standard displaced parallel to sea bass plasma and pituitary samples, as well as to pituitary extracts of other perciform fishes. Treatment of mature female sea bass with GnRHa ([D-Ala⁶, Pro⁹-Net]-LHRH) increased plasma LH levels from undetectable values to around 30 ng/ml at 1.5 hr after injection, depending on the GnRHa dose and was maintained high for 24 hr. In conclusion, the developed ELISA is a sensitive and accurate immunoassay, suitable for LH measurements in biological samples of sea bass and related fish species.

Keywords: Reproduction, luteinizing hormone, purification, immunoassay, ELISA, GnRHa, sea bass, fish.

Purificación de la hormona luteinizante (LH) de la lubina (*Dicentrarchus labrax*) y desarrollo de un inmunoensayo específico (ELISA)

Resumen

En este trabajo se describe la purificación de la hormona luteinizante (LH) a partir de pituitarias de lubina (*Dicentrarchus labrax*), mediante extracción con etanol, cromatografía de exclusión molecular en Superdex-G100, cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose y cromatografía de exclusión molecular en Superdex-75. Las subunidades de la LH, α y β , se aislaron mediante rpHPLC. Por SDS-PAGE, se estimó que el peso molecular de la LH era de 31 kD, y que el de las subunidades LH- α y LH- β era de 12 y 22 kD, respectivamente. Se desarrolló un inmunoensayo de tipo ELISA, usando anticuerpos específicos contra la subunidad LH- β de la lubina. El ELISA obtuvo una sensibilidad de alrededor de 0.65 ng/ml (Bi/Bo 80%) y unos coeficientes de variación de intra e interensayo del 11.7% (n=8) y 11% (n=10), respectivamente. En el ELISA, se obtuvieron curvas de desplazamiento paralelas entre la LH y muestras de plasma y pituitaria de lubina, así como con extractos hipofisarios de otras especies de perciformes. El tratamiento de lubinas hembras maduras con varias dosis de GnRH α ([D-Ala⁶, Pro⁹-Net]-LHRH) incrementó los niveles plasmáticos de la LH desde niveles indetectables hasta alrededor de 30 ng/ml 1.5 hr después de la inyección, estos niveles se mantuvieron altos durante 24 hr. En conclusión, el ELISA es un inmunoensayo sensible y preciso, apropiado para cuantificar la LH en muestras biológicas de la lubina y de otras especies de peces relacionadas.

Introduction

The European sea bass is one of the most important aquaculture species in Europe and also an important research model for studies on fish endocrinology. Reproduction of sea bass occurs once a year at the wintertime. Females present a group-synchronous type of ovary and they are multiple batch spawners, with 3-4 successive depositions of eggs during the 2-3 months spawning period. In captivity, sea bass reproduces spontaneously, but its reproduction still presents serious problems, such as unpredictability of spawns, desynchronization of the broodstock and diminished quantity and quality of the eggs (Carrillo *et al.*, 1995). These problems are general in most farmed fish. The development of adequate hormonal techniques for the control of reproduction is critical to reduce these reproductive dysfunctions, but they require a comprehensive knowledge of the reproductive biology of the species. In the sea bass, a good deal of information have been obtained in the last years on its reproductive endocrinology, which has been possible because of the development of specific immunoassays for critical proteins and hormones, such as vitellogenin (Mañanós *et al.*, 1994), sexual steroids (Prat *et al.*, 1990), thyroid hormones (Cerdá-Reverter *et al.*, 1996) and GnRHs (Rodríguez *et al.*, 2000).

The gonadotropins (GTHs), luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH), are the key hormones in the control of reproduction in vertebrates. The GTHs, synthesized in the pituitary, are heterodimeric glycoproteins, constituted by a common α subunit non-covalently bound to a hormone specific β subunit (Pierce and Parsons, 1981; Laphorn *et al.* 1994). The bioactive dimer is synthesized and secreted by the pituitary and regulate all processes of reproduction, with the FSH controlling first stages of gametogenesis and LH regulating final gonadal maturation and ovulation/spermiation (Gómez, 1999). The release of GTHs, mainly that of LH, is regulated from the brain by the neuropeptide gonadotropin-releasing hormone (GnRH). At final stages of the reproductive cycle, the GnRH acts into the pituitary to stimulate the synthesis and secretion of LH and thus, the cascade of hormonal events that promotes final gonadal maturation, ovulation/spermiation and spawning (Breton *et al.*, 1993).

Native GnRHs or synthetic analogues (GnRHa) have been widely used in all vertebrates for the treatment of several reproductive dysfunctions and in fertility trials. In fish aquaculture, GnRHa treatment is used to induce spawning, with variable success depending on the species (Zohar and Mylonas, 2001). The development of efficient GnRHa-based spawning induction therapies depends on our ability to measure the LH releasing potency of these treatments. The availability of an LH immunoassay is also an important tool to follow hormonal profiles during the reproductive cycle of a given species, which give us information on the reproductive performance of the broodstock and on the critical periods sensitive for exogenous hormonal treatments.

The species specificity of the GTHs requires the development of specific antibodies for each species under study, or for closely related species. In the last decades, radioimmunoassays (RIAs) or enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for LH have been developed for several fish species. Both types of immunoassays have similar characteristics of sensitivity and accuracy, but ELISAs have the advantage of using enzyme-labeled tracers instead of radioactive tracers, thus avoiding the use of radioactivity on the assay (Engvall, 1980).

The objective of the present study was to purify the LH in the sea bass, produce specific antibodies and develop an ELISA for measuring LH levels in sea bass and related species. The immunoassay was tested to analyze the LH releasing potency of a GnRHa used for spawning induction trials in sea bass.

Material and methods

Purification of LH

Four hundred pituitaries (2.6 g wet weight) were collected from sexually mature male and female sea bass, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. Pituitaries were homogenized in 10% ammonium acetate, pH 7.2, 1 mM PMSF, on ice, using a mechanically driven glass Teflon homogenizer. The homogenate was stirred



for 1 h at 4°C and centrifuged (5,000g for 45 min at 4°C) to eliminate debris. The supernatant was adjusted to 40% ethanol, 1 mM PMSF, by slow addition of ice-cold ethanol and stirred overnight at 4°C to solubilize glycoproteins. After centrifugation (15,000g for 20 min at 4°C), the supernatant was adjusted to 85% ethanol, 1 mM PMSF, by slow addition of ice-cold ethanol and kept at 4°C overnight without stirring, for precipitation of glycoproteins. The precipitate was centrifuged (20,000g for 30 min at 4°C), supernatant discarded and the pellet air-dried to eliminate excess of ethanol. Prior to gel filtration, the moist pellet was dissolved in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8.

The ethanol extract was fractionated by gel filtration chromatography, on a 2.5 x 100 cm column of Superdex G100 Superfine (Pharmacia-LKB Biotechnology, NJ). Sample was eluted with 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8, at a flow rate of 0.5 ml/min. Fractions of 1 ml were collected every 2 min and the absorbance monitored at 280 nm. Fractions comprising each peak were pooled and lyophilized. Presence of gonadotropins (GTHs) or their subunits was monitored by characteristic elution on SDS-PAGE and reversed-phase high performance liquid chromatography (rpHPLC). The presence of GTHs in the fractions of the subsequent chromatography steps was tested using similar techniques.

The lyophilized fractions containing putative LH were dissolved in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8 and subjected to ion-exchange chromatography (IEC) on a 1x5 cm column of DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia-LKB). Unabsorbed proteins were eluted with the same buffer. Adsorbed proteins were eluted with a stepwise gradient of 100, 200, 500 and 1000 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8, at a flow rate of 20 ml/h. Fractions of 3 ml were collected every 9 min. Fractions comprising each peak were pooled, lyophilized and tested for the presence of GTHs and their subunits.

The peak containing putative LH was subjected to gel filtration chromatography, on a 1.6 x 60 cm column of Superdex 75 Hiload (Pharmacia-LKB), at a flow rate of 12 ml/hr. The sample was dissolved and eluted with 150 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8. Fractions of 4 ml were collected every 20 min and the absorbance monitored at 280 nm. Fractions comprising protein peaks were pooled and lyophilized. The presence and

identity of LH and its subunits was determined by rpHPLC, SDS-PAGE and N-terminal amino acid sequencing.

Isolation and analysis of LH subunits

The LH subunits were isolated by rpHPLC, on a C18 TSK gel ODS-120T column (0.46 x 25 cm; 5 μ m particle size. Tosoh, Japan) using a binary pump HPLC system (Konik Inc., FL). Samples were eluted with a linear gradient of 20-50% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), for 60 min at a column temperature of 40°C and a flow rate of 1 ml/min. Protein peaks from the rpHPLC were analyzed by SDS-PAGE, MALDI-TOF mass spectrometry and N-terminal amino acid sequencing.

MALDI-TOF mass spectrometry was performed at the National Center of Biotechnology (C.S.I.C., Madrid, Spain). For analysis, lyophilized samples of purified subunits were dissolved in 10 μ l of 50% aqueous acetonitrile, 0.1% TFA, at a concentration of 10 pmol/ μ l and mixed to an equal volume of saturated trans-3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid in 30% aqueous acetonitrile and 0.1% TFA. The sample (0.5 μ l of the mixture) was deposited on a stainless steel probe tip, allowed to dry at room temperature for 5 min and measured on a Bruker Reflex II MALDI-TOF mass spectrometer (Bremen, Germany).

N-terminal amino acid sequence analysis of the LH subunits was performed at the National Center of Biotechnology (C.S.I.C., Madrid, Spain), using a Precise Protein Sequencing System Sequenator (model 494, Applied Biosystems, CA). The obtained sequences were compared to similar sequences on the BLAST-2 service protein database, at the web site <http://www.bork.embl-heidelberg.de/Blast2>.

Electrophoresis was performed on 5% stacking and 15% separating SDS-polyacrylamide slab gels (80x50x0.75 mm), under non-reducing conditions and proteins visualized after silver staining. Molecular weights were calculated from the SDS-PAGE gels using low molecular weight standards (BioRad, CA).

Preparation of LH β subunit antibodies (AbLH β)

Purified LH β subunit was used for immunization of two rabbits. Lyophilized LH β was resuspended in 0.9% NaCl at a concentration of 0.1 μ g/ml and stored aliquoted at -80°C . For the first injection, each rabbit received 1 ml of an emulsion prepared with equal volumes of LH β solution (50 μ g of LH β in 0.9% NaCl) and Complete Freund's Adjuvant, given at several points under the dorsal skin. Five subsequent injections, each of 50 μ g of LH β dissolved in Incomplete Freund's Adjuvant, were given intranodally every 4 weeks, until no increase in the antibody titer was detected. The titer of the antibody was tested by ELISA, on 96-well plates (high-binding, Costar Corporation, MA), by incubating LH β coated wells with serial dilutions of immune serum and further development with HRP-labeled goat-anti-rabbit antibodies. At the end of the immunization procedure, rabbits were bled, serum separated by centrifugation (2,000g, 20 min, 4°C) and stored at -20°C .

Development and validation of the LH ELISA

A competitive ELISA was developed, based on the protocol described for sea bass vitellogenin ELISA (Mañanós *et al.*, 1994) and striped bass LH ELISA (Mañanós *et al.*, 1997). The ELISA procedure is as follows:

1. Coating the wells of the microplates (overnight at 4°C) with 100 μ l/well of a 10 ng/ml sea bass LH β solution, prepared in 50 mM carbonate buffer, pH 9.6. Three wells per plate were coated with the same concentration of bovine serum albumin (BSA), to determine non-specific binding (NSB). After coating, wells were washed (3x1 min) with PBST buffer (10 mM phosphate buffer, pH 7.2, containing 0.9% NaCl and 0.05% Tween-20).

2. Saturation the wells (30 min at 37°C) with 200 μ l/well of assay buffer (PBST buffer, containing 2% normal goat serum). Washing (3x1 min) with PBST buffer.

3. Incubation with specific antibodies (AbLH β) and samples. Before distribution into the wells, standard and unknown samples were first preincubated with the AbLH β (final dilution 1/80,000) in tubes (overnight at 4°C). The standard curve ranged from 0.2 to 26 ng/ml. All samples were diluted in assay buffer. After preincubation, samples and standards were dispensed in duplicates (100 μ l/well) into the coated wells and incubated for 90 min at 37°C. The NSB wells and five LH β coated wells (maximum binding, Bo) received only AbLH β solution. After incubation, wells were washed (3x1 min) with PBST buffer.

4. Incubation with secondary antibodies. Bound antigen-antibody complexes were detected by incubation (100 μ l/well, 30 min at 37°C) with HRP-labeled goat anti-rabbit IgG (GAR-HRP, affinity purified ETA grade, Biorad), diluted at 1/3,000 in assay buffer. After incubation, wells were washed (3x1 min) with PBST buffer.

5. Color development was performed by addition of 100 μ l/well of TMB peroxidase substrate solution (BioRad). The reaction (complete darkness at room temperature) was stopped after 20 min by addition of 100 μ l/well of 1 N H₂SO₄. Absorbances were read after 5 min at 450 nm, using an automatic microplate reader (BioRad).

For validation of the assay, plasma and pituitary samples of sea bass were used. Plasma was obtained by centrifugation (2,500g for 20 min at 4°C), from blood collected on heparinized tubes. Pituitaries were collected from anesthetized fish (300 ppm of 2-phenoxiethanol), homogenized in 0.5 ml of 10 mM phosphate buffer, pH 7.2, 0.9% NaCl, on ice and centrifuged (2,500g for 30 min at 4°C) to eliminate debris. Displacement curves for plasma and pituitary samples were obtained by serial dilutions of the sample in ELISA assay buffer and compared to the ELISA standard curve. Physiological validation of the assay was performed, by measuring plasma LH levels in GnRH α -treated fish (mature female sea bass, 4 years old, mean weight 0.8 \pm 0.25 Kg). Before treatment, ovarian biopsies were taken from anaesthetized fish and twenty-four females containing postvitellogenic follicles (~450 μ m diameter) were selected and divided into three homogenous groups (n=6). Fish were injected intraperitoneally with 5, 25 or 50 μ g/kg

BW of GnRHa ([D-Ala⁶, Pro⁹ NET]-mGnRH, Sigma) dissolved in 0.9% NaCl, whereas controls were injected with 0.9% NaCl. Plasma samples were obtained at 1.5, 3, 6, 12 and 24 h after treatment.

Statistics

All data are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Differences between means were tested by the analysis of variance (ANOVA) followed by the LSD (Least Significant Differences) range test. Previously, the Kolmogorov-Smirnov test and Bartlett's test verified normality and homogeneity of variances, respectively. In all cases, significance was accepted at $p < 0.05$. For data calculations in the ELISA, sigmoid curves were linearized using the logit transformation, where $\text{logit}(B/Bo) = \ln(B-N/Bo-B)$, B representing the binding of each point, Bo the maximum binding and N the non-specific binding. Parallelism between displacement curves was tested by the analysis of covariance. Linear regressions were tested by the method of least squares.

Results

Purification of sea bass LH and subunits

The LH was purified from pituitaries of mature male and female sea bass. Pituitary glycoproteins were extracted with ethanol and LH purified by several chromatographic steps (Fig. 1).

First, the pituitary ethanol extract was subjected to gel filtration chromatography on Superdex G100, resulting on the elution of six major peaks (Fig. 1a). Fractions comprising each peak were pooled and analyzed on SDS-PAGE and rpHPLC and showed the presence of an LH-like protein on peak G4. Elution of peak G4 on SDS-PAGE, under non-reducing conditions showed, together with other proteins, a major protein band of 31 kD, which dissociated in two minor bands of 12 and 22 kD under reducing conditions. On

rpHPLC, peak G4 was resolved in several peaks, which corresponded to single proteins as showed by SDS-PAGE analysis. The 12 kD and 22 kD proteins were detected on peaks eluted at 40 min and 45 min. N-terminal sequencing of these two peaks indicated that they corresponded to putative sea bass LH- α and LH- β , respectively. Free LH- α and LH- β subunits were also detected on fractions G5 and G6, which eluted close to peak G4, while fractions G1, G2 and G3 contained other proteins.

Second, peak G4 was subjected to an ion-exchange chromatography (IEC), on a DEAE-Sepharose column. Elution with a stepwise gradient of ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8, resolved the sample in five different peaks (Fig. 1b). By SDS-PAGE and rpHPLC, putative LH was detected on fractions eluted with 500 mM ammonium bicarbonate (peak IEC4), while free subunits were eluted at 200 mM ammonium bicarbonate. Final purification of putative LH was achieved by gel filtration chromatography on Superdex 75, from the IEC4 fraction containing putative LH (Fig. 1c).

Isolation of LH α and β subunits was performed by rpHPLC (Fig. 2). Subunits were mostly obtained from the IEC peak eluted at 200 mM ammonium bicarbonate, although some amounts of free subunits were also obtained from other IEC peaks or after dissociation of intact LH.

Identity and purity of the isolated sea bass LH and its subunits was tested by SDS-PAGE, rpHPLC, MALDI-TOF mass spectrometry and N-terminal amino acid sequencing. On SDS-PAGE, the intact LH preparation was resolved as a single protein band (Fig. 2), with the expected molecular weight of an LH-like protein (around 30 kD). On rpHPLC, under acidic conditions, the intact LH preparation was separated in two peaks (Fig. 2) and each peak was resolved on SDS-PAGE as single protein bands, at positions corresponding to the expected molecular weight of putative LH α and β subunits, around 12 and 22 kD, respectively (Fig. 2). The N-terminal amino acid sequencing of the rpHPLC peaks revealed single N-terminal residues for each peak, indicating the purity of the preparation. The N-terminal sequence of the putative LH- α preparation was Y-P-S-M-D-L-S-N-M-G and that of the putative LH- β was F-Q-L-P-P-

C-Q-L-I-C, which corresponded to the known amino acid sequences of sea bass LH subunits deduced from their respective cDNAs (Mateos *et al.*, 2003). Analysis of the LH subunits by MALDI-TOF mass spectrometry, gave molecular weights of 12.395 kD for LH- α and 15.134 kD for LH β , and potential formation of dimers, trimers and tetramers in both cases.

Development and validation of the sea bass LH ELISA

A competitive ELISA was developed for LH measurements in pituitary and plasma samples, using purified intact LH as standard, the LH β subunit for coating the 96-well microplates and specific LH β subunit antibodies for detection. For the set-up of the ELISA, dilution tests were carried out to determine appropriate dilutions of the antigen (coating step) and the specific antibody (competition step), to get Bo absorbance values around 1.0. Testing different conditions for the competition step, best results of sensitivity and reproducibility were obtained for incubation times between 75 and 120 min at 37°C (in the microplates), preceded by an overnight preincubation at 4°C. In the incubation with the secondary antibodies (GAR-HRP), saturation of Bo absorbance was reached at 20 min and at concentrations not higher than 1:3,000. Time-course tests for step 5 showed no increase in color development after 20 min. In the optimized conditions, the detection limit of the standard curve was around 25 pg/well (Bi/Bo 85%) and half-maximum displacement occurred at 80 pg/well (Bi/Bo 50%). A typical standard curve of the ELISA is shown in figure 3, together with parallel displacements of pituitary and plasma dilution curves. The precision of the assay was estimated by calculating the intra- and inter-assay coefficients of variation (CV). The intra-assay CV, calculated by measuring replicates of the same sample within an assay, was estimated as 13.5 % (n=8) and 11.7 % (n=8), for two pituitary samples containing high (Bi/Bo 35 \pm 1.6%) and low (Bi/Bo 55 \pm 2.3%) concentrations of LH, respectively. The inter-assay CV, calculated by measuring replicates of the same sample in different assays (n=10), was estimated as 8.6%, 11.0% or 6.5%, when calculated at 28 \pm 0.8%, 51 \pm 1.8% or 73 \pm 1.5% of binding (Bi/Bo),

respectively. Linearization of the sigmoid dilution curve of sea bass pituitary extract, showed parallel displacement with pituitary extracts from other fish species (Fig. 3b), which allowed the use of the ELISA for LH measurements in these perciform fishes.

Physiological validation of the ELISA was done by measuring LH plasma levels in mature female sea bass, treated with several doses of a GnRHa ([D-Ala6, Pro9NET]-LHRH). A single injection of 5, 25 or 50 µg/kg of GnRHa stimulated LH release at 1.5 h post-injection, from undetectable levels to around 30 ng/ml (Fig. 4). In controls, LH plasma levels were undetectable throughout the experiment. All doses of GnRHa maintained elevated LH plasma levels during 24 h. High (50 µg/kg) and medium (25 µg/kg) doses of GnRHa were equally potent in inducing LH release and were significantly higher than plasma levels stimulated by the low GnRHa dose (5 µg/kg), from 6 to 12 h post-injection.

Discussion

In this study, chromatographic procedures similar to those described for the isolation of salmonid GTHs (Kawauchi *et al.*, 1989; Swanson *et al.*, 1991) and striped bass LH (Mañanós *et al.*, 1997), have been used for the purification of LH in the sea bass. Chemical methods demonstrated that this purification procedure yielded highly purified preparations of intact LH and its α and β subunits. Molecular weight of the LH intact hormone was determined by SDS-PAGE as 31 kD, similar to that of other teleost LHs, which ranged from 27 to 39 kD, depending on the species (Swanson *et al.*, 1991; Van Der Kraak *et al.*, 1992; Koide *et al.*, 1993; Okada *et al.*, 1994; Mañanós *et al.*, 1997; Weltzien *et al.*, 2003). The isolated LH α and β subunits were resolved by SDS-PAGE as single bands, at positions corresponding to molecular weights of 12 kD and 22 kD, for the α and β subunits, respectively. These values are close to those reported in other fish species, which ranged from 15 to 22 kD for LH- α and from 18 to 24 kD for LH β (Swanson *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1988a; Van Der Kraak *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1993; Okada *et al.*, 1994; Mañanós *et al.*, 1997; Weltzien *et al.*, 2003). The molecular weight of the isolated

sea bass LH subunits was accurately calculated by MALDI-TOF spectrophotometry, which gave molecular weights of 12.4 kD for LH- α and 15.1 kD for LH- β . The overestimated values obtained by SDS-PAGE were probably caused by interference of carbohydrate residues in the mobility of the proteins on the SDS-PAGE gels.

The purified sea bass LH was fractionated by rpHPLC in two peaks, under acidic conditions, suggesting a single molecule composed of two subunits. The jagged-shape of the rpHPLC peaks for the α and β subunits, probably reflects the presence of different glycosylated isoforms of the subunits. The existence of LH α and β subunit isoforms has been demonstrated in fish and other vertebrates. It has been suggested that the presence of several LH isoforms is important in conferring different levels of biological activity to the hormone (Chopineau *et al.*, 1997; Chabot *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2001). In our purification protocol, no traces of FSH or FSH- β subunit were found, when several rpHPLC peaks were analyzed by N-terminal amino acid sequencing. It might be possible that the content of FSH in the pituitaries used for the purification protocol was low. The pituitaries were obtained from fish undergoing final stages of gonadal maturation. Studies in salmonids have shown that, at this particular reproductive stage, the pituitary content of LH is highest, whereas that of FSH is low, indicating the predominant role of LH in regulating gonadal maturation and FSH regulating initial phases of gametogenesis (Swanson, 1991; Slater *et al.*, 1994).

The developed sea bass LH ELISA has a sensitivity of around 0.65 ng/ml, although concentrations as low as 0.15 ng/ml produced significant displacement of the binding. Previous RIAs developed for fish LHs have sensitivities ranging from 300 pg/ml to 7 ng/ml (Tanaka *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1985; Kobayashi *et al.*, 1987; Zohar *et al.*, 1990; Hernández *et al.*, 2002). The sensitivities of LH ELISAs described for fish ranged from 70 to 156 pg/ml (Kah *et al.*, 1989; Salbert *et al.*, 1990; Mañanós *et al.*, 1997). Also, the intra and inter-assay coefficients of variation of the sea bass LH ELISA was similar to those of other fish LH immunoassays (Kobayashi *et al.*, 1985; Kobayashi *et al.*, 1987; Suzuki *et al.*, 1988b; Tanaka *et al.*, 1993; Hernández *et al.*, 2002; Salbert *et al.*, 1990; Mañanós *et al.*, 1997).

The ELISA was validated for LH measurements in plasma and pituitary extracts of sea bass and other perciform species. Displacement curves obtained with serial dilutions of pituitary extracts from sea bass and other sparidae fish were parallel to the standard curve, which allowed the use of the assay for LH measurements in these species. This apparent low degree of species specificity of our ELISA is probably due to the use of antibodies against the LH β subunit. Phylogenetic studies have demonstrated that there is a high degree of homology between the LH β sequences from closely related fish species (Quérat *et al.*, 2000).

Treatment of mature female sea bass with GnRHa induced the expected elevation of plasma LH levels. The GnRHa is a potent inducer of LH release from the pituitary (Zohar and Mylonas, 2001) and is widely used for hormonal induction of spawning in sea bass and other fish species (Mylonas and Zohar, 2001). The doses tested in the present study (5, 25 and 50 GnRHa ug/kg), are within the range of the doses normally used for spawning induction of fish. Treatment of sea bass with a single injection of 15 ug/kg GnRHa induce spawning in 100% of the females at 48-72 h after injection (Fornies *et al.*, 2001). The induction of egg release by GnRHa is a consequence of the stimulation of gonadal maturation, through a cascade of hormonal events which first step is the GnRHa-induced LH release from the pituitary. Our present work showed that GnRHa treatment induced a first elevation of plasma LH at 1.5 hr after injection and LH levels were maintained high above controls for 24 hr. Although the first LH surge is similarly induced by all three doses, plasma LH levels from 6 to 12 hr were significantly higher for fish treated with high GnRHa doses than for fish treated with the low dose. It is possible that the first LH surge detected at 1.5 hr after injection reflects the GnRHa-induced release of the LH stores of the pituitary, which could be similar for all three GnRHa doses. The second elevation of plasma LH levels, observed after 6 hr of injection, could be a consequence of the GnRHa-induced release of newly synthesized LH, which could be differently affected by the different doses of GnRHa (Mañanós *et al.*, 2002). The stimulatory effect of GnRHa on LH synthesis has been demonstrated in several fish species. Treatment with exogenous GnRHa induced elevation of mRNA levels of LH- α

and LH- β subunits, in immature sea bass (Mateos *et al.*, 2003) and sexually mature goldfish (Khakoo *et al.*, 1994), suggesting a GnRHa stimulatory action on LH synthesis in the pituitary. It is unknown if different degrees of stimulated LH synthesis, induced by different doses of GnRHa, can cause different physiological effects in promoting final gonadal maturation and ovulation processes. And thus future studies will be necessary to determine the physiological consequences that different GnRHa-induced plasma LH levels can have in regulating differently final gonadal maturation and ovulation and in the quality of spawning.

In conclusion, highly purified preparations of LH and its α and β subunits have been obtained from pituitaries of sea bass and allowed the development of an ELISA for LH measurements in sea bass and related fish species. The ELISA showed good characteristics of sensitivity, precision and accuracy. The availability of an LH ELISA will enable further research on the reproductive endocrinology of sea bass and related species and will be a useful tool for the optimization of spawning induction therapies in these species.

References

- Breton B, Mikolajczyk T, Popek W. The neuroendocrine control of the gonadotropin (GtH2) secretion in teleost fish. In: Lalhous B, Vitello (eds.), "Aquaculture: Fundamental and applied research". American Geophysical Union. 1993; 199-215.
- Carrillo M, Zanuy S, Prat F, Cerda J, Ramos H, Mañanós E, Bromage N. Sea bass. In: Bromage NR, Roberts J (eds.). Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell Science, London. 1995; 138-168.
- Cerda-Reverter JM, Zanuy S, Carrillo M, Kah O. Development of enzyme immunoassays for 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and L-thyroxine: time-course studies on the effect of food deprivation on plasma thyroid hormones in two marine teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). Gen Comp Endocrinol. 1996;103(3):290-300.

- Chabot V, Magallon T, Taragnat C, Combarnous Y. Two free isoforms of ovine glycosylation hormone α -subunit strongly differ in their ability to stimulate prolactin release from foetal pituitaries. *J Endocrinol* 2000; 164:287-297.
- Chopineau M, Maritainat N, Marichatou H, Troispoux C, Auge-Gouillou C, Stewartz F, Combarnous Y, Guillou F. Evidence that the α -subunit influences the specificity of receptor binding of the equine gonadotropins. *J Endocrinol* 1997; 155:241-245.
- Engwall, E. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Meth Enzymol* 1980; 70: 419-439.
- Fornies MA, Mañanós E, Carrillo M, Laureau S, Mylonas CC, Zohar Y, Zanuy S. Effectiveness of different GnRHa-delivery systems on spawning induction in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 2001; 202: 221-234.
- Gómez JM, Weil C, Ollitrault M, Le Bail P-Y, Breton B, Le Gac F. 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* 1999; 113: 413-428.
- Hernandez MPG, Ayala AG, Agulleiro B, Garcia A, Van Dijk W, Schulz RW. Development of a homologous radioimmunoassay for Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*, Risso 1810) LH. *Aquaculture* 2002; 210(1-4):203-218
- Kah O, Pontet A, Núñez-Rodríguez J, Calas A, Breton B. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for goldfish gonadotropin. *Biol Reprod* 1989; 40:68-73.
- Kawauchi H, Suzuki K, Itoh H, Swanson P, Naito N, Nagahama Y, Nomki M, Nakai Y, Itoh S. The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiol Biochem* 1989; 7:29-38.
- Khakoo Z, Bhatia A, Gedamu L, Habibi HR. Functional specificity for salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II coupled to the gonadotropin release and subunit messenger ribonucleic acid level in the goldfish pituitary. *Endocrinology* 1994; 134: 838-847.
- Kobayashi M, Aida K, Hanyu I. Radioimmunoassay for silver carp gonadotropin. *Bull Japan Soc Sci Fish* 1985; 51:1085-1091.

- Kobayashi M, Aida K, Sakai H, Haneko T, Ashashina K, Hanyu I, Ishii S. Radioimmunoassay for salmon gonadotropin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1987; 53:995-1003.
- Koide, Y, Itoh, H, Kawauchi, H. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins, GTHI and GTHII, from bonito (*Katsuwonus plelami*) pituitary glands. *Int J Pept Protein Res* 1993; 41: 52-65.
- Lapthorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, Morgan FJ, Isaacs NW. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 1994; 369:455-461.
- Mañanós E, Nuñez J, Zanuy S, Carrillo M, Le Menn F. Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin II-Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comp Biochem Physiol* 1994; 107B(2): 217-223
- Mañanós EL, Swanson P, Stubblefield J, Zohar Y. Purification of gonadotropin II from a teleost fish, the hybrid striped bass, and development of a specific enzyme-linked immunosorbent assay. *Gen Comp Endocrinol* 1997; 108: 209-222.
- Mañanós EL, Carrillo M, Sorbera LA, Mylonas CC, Asturiano JF, Bayarri MJ, Zohar Y, Zanuy S. Luteinizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of European sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin-releasing hormone analogue. *Journal of Fish Biology* 2002; 60:328-339.
- Mateos J, Mañanós EL, 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.* 133/2: 216-232.
- Mylonas CC, Zohar Y. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. *Aquaculture* 2001; 202: 205-220.
- Okada, T., Kawazoe, I., Kimura, S., Sasamoto, Y., Aida K., Kawauchi, H. Purification and characterization of gonadotropin I and II from pituitary glands of tuna (*Thunnus obesus*). *Int J Peptide Protein Res* 1994; 43:69-80.

- Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 1981; 50:465-495.
- Prat F, Zanuy S, Carrillo M, de Mones A, Fostier A. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Gen Comp Endocrinol* 1990; 78: 361-373.
- Quérat B, Sellouk A, Salmon C. Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) β subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. *Biol Reprod* 2000; 63:222-228.
- Rodríguez L, Carrillo M, Sorbera LA, Soubrier MA, Mañanos E, Holland MC, Zohar Y, Zanuy S. Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. *Gen Comp Endocrinol*. 2000;120(1):67-74.
- Salbert G, Bailhache T, Zohar Y, Breton B, Jégo P. A rapid and sensitive ELISA for rainbow trout maturational gonadotropins (tGTH II): validation on biological samples; in vivo and in vitro responses to GnRH. *Gen Comp Endocrinol* 1990; 78:110-122.
- Santos EM, Rand-Weaver M, Charles RT. Follicle-Stimulating Hormone and its α and β subunits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): purification, characterization, development of specific radioimmunoassays, and their seasonal plasma and pituitary concentrations in females. *Biol Reprod* 2001; 65:288-294
- Slater CH, Schreck CB, Swanson P. Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp Biochem Physiol* 1994; 109A(1): 167-175.
- a. Suzuki K, Kawauchi H, Nagahama Y. Isolation and Characterization of subunits from two distinct Salmon Gonadotropins. *Gen Comp Endocrinol* 1988; 71:302-306.
 - b. Suzuki K, Kanamori A, Nagahama Y, Kawauchi H. Development of salmon GTH I and GTH II radioimmunoassays. *Gen Comp Endocrinol* 1988; 71:459-467.

- Swanson P. Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. In: Scott AP, Sumpter JP, Kime DM, Rolfe MS (eds.). Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of East Anglia, Norwich, UK, Fish Symposium 1991: 2-7.
- Swanson P, Suzuki K, Kawauchi H, Dickhoff WW. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biol Reprod* 1991; 44: 29-38.
- Tanaka, H., Kagawa, H., Okazawa, K. and Hirose, K. Purification of gonadotropins (PmGTH I and II) from red seabream (*Pagrus major*) and development of a homologous radioimmunoassay for PmGTH II. *Fish Physiol Biochem* 1993; 10: 409-418.
- Van Der Kraak, G., Suzuki, K., Peter, E., Itoh, H., Kawauchi, H. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *Gen Comp Endocrinol* 1992; 85: 217-229.
- Weltzien FA, Norberg B, Swanson P. Isolation and characterization of FSH and LH from pituitary glands of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Gen Comp Endocrinol*. 2003; 131: 97-105.
- Zohar Y, Breton B, Sambroni E, Fostier E, Tosky G, Pagelson G, Leibovitz D. Development of a homologous radioimmunoassay for a gonadotropin of the gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 1990; 88:189-204.
- Zohar Y, Mylonas CC. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 2001; 197: 99-136.

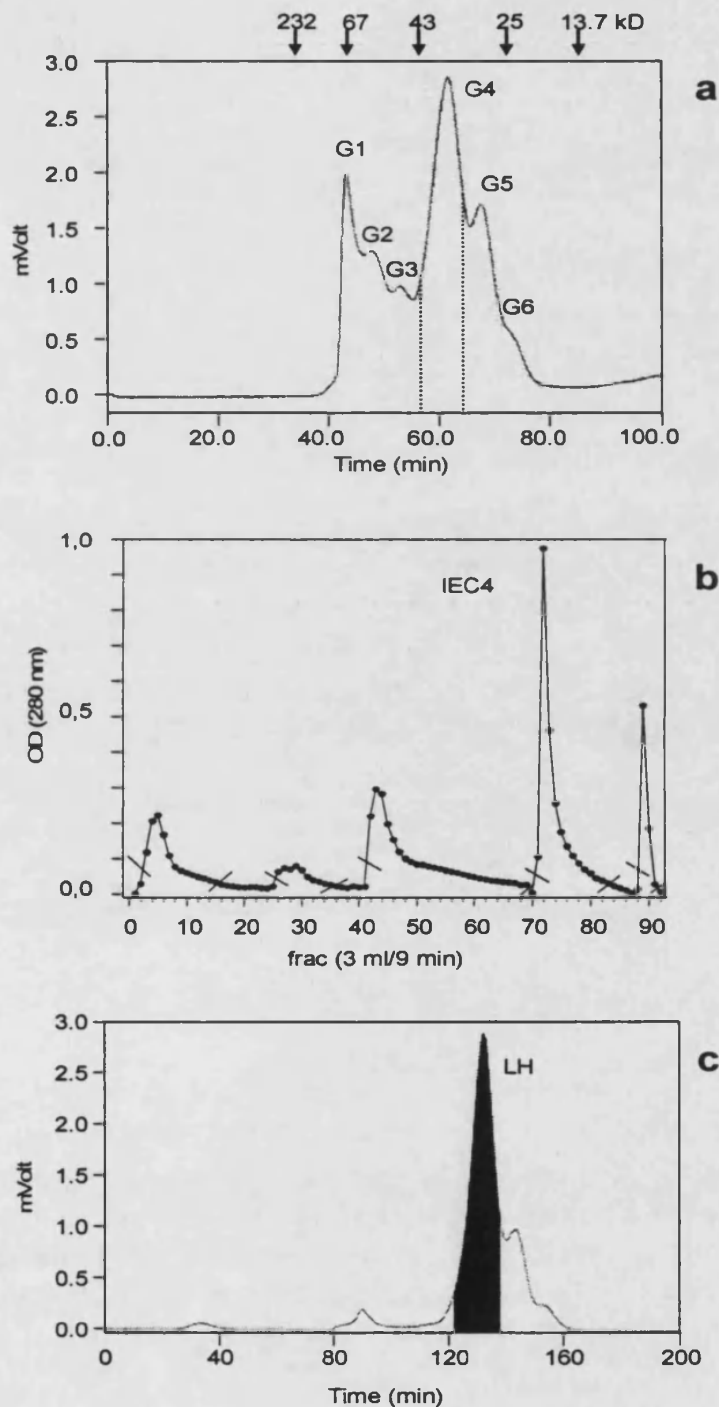


Fig. 1.

Three-step chromatographic procedure for the purification of sea bass LH. (a) Gel filtration of the pituitary ethanol extract on Superdex G100. LH-like protein was detected on peak G4. The position of protein weight markers is given on the top in kD. (b) Ion-exchange of peak G4 on DEAE-Sepharose CL-6B. Sample was eluted with a stepwise gradient of ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8 (50-100-200-500-1000 mM, given on fractions 0-24-40-68-87, respectively). LH-like protein was detected on peak IEC4. (c) Gel filtration of peak IEC4 on Superdex 75.

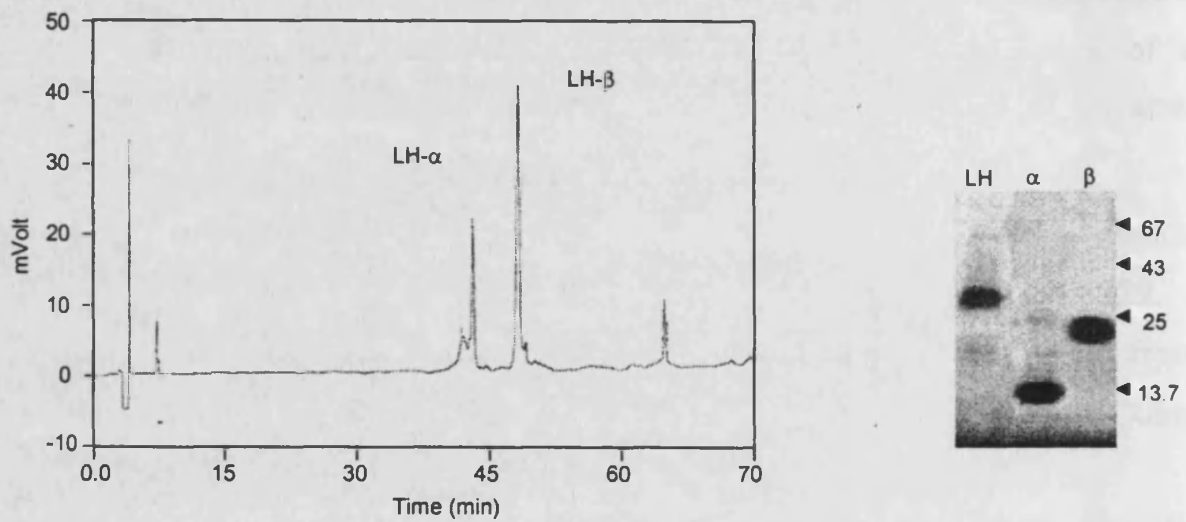


Fig. 2.

Isolation of LH- α and LH- β subunits by rpHPLC. The sample, intact LH, was dissolved in 0.1% TFA and eluted with a linear gradient of 20-50 % acetonitrile, 0.1 % TFA, on a ODS-120T TSK-GEL column. Fractions of 1 ml were collected every minute. The gel shows the elution on SDS-PAGE, under non-reducing conditions, of intact LH (sample before treatment for rpHPLC) and the rpHPLC isolated α and β subunits. The position of weight markers on the gel is given on the right.

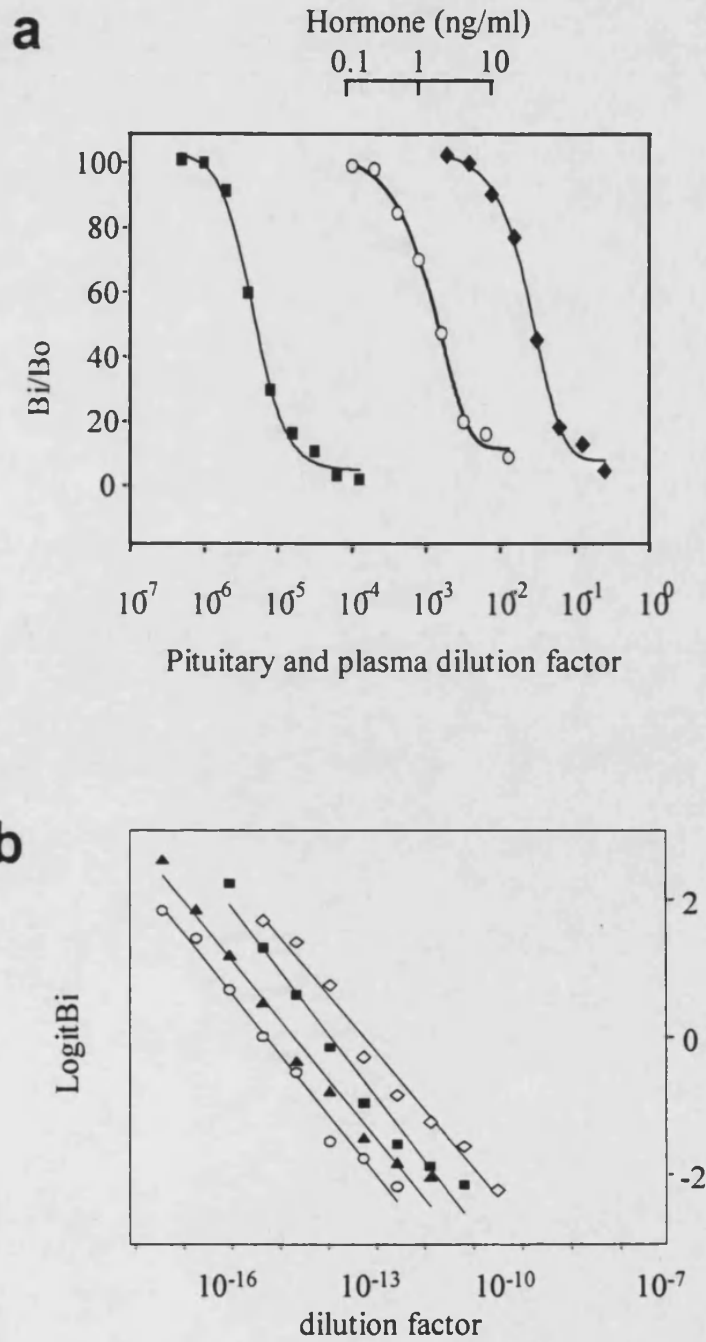


Fig. 3.

(a) Sigmoid representation of a typical standard curve of the sea bass LH ELISA (white circles). Dilution curves of sea bass plasma (black rhombus) and pituitary extract (black squares) were parallel to the standard. (b) Logit transformation of dilution curves of pituitary extracts, showing parallelism between samples from sea bass (white circles) and other perciform fishes, such as *Sparus aurata* (black triangles), *Dentex dentex* (black squares) and *Pagrus bogaraveo* (white rhombus).



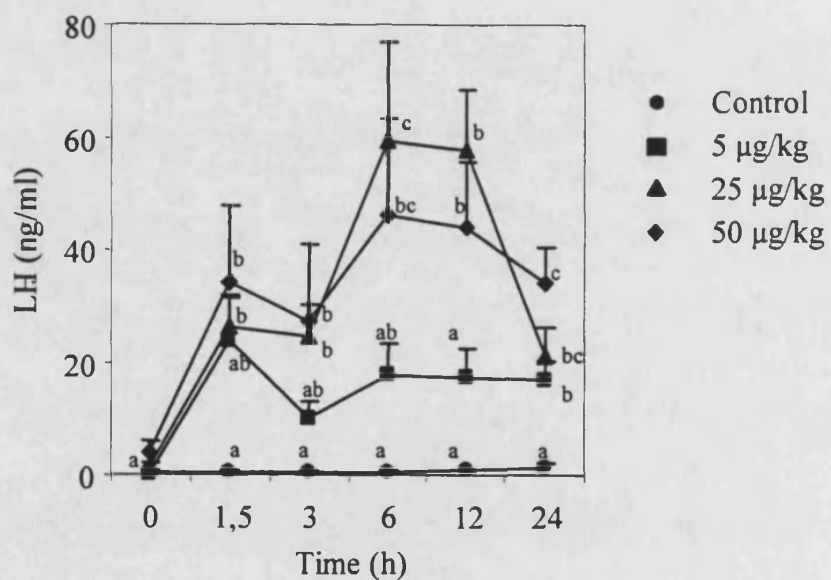


Fig. 4.

Plasma LH levels in mature female sea bass, after a single injection of different doses of [D-Ala6, Pro9-Net]-LHRHa.

Effects of sustained administration of testosterone in pre-pubertal sea
bass (*Dicentrarchus labrax* L)

Silvia Zanuy^a, Manuel Carrillo^a, Jorge Mateos^a, Vance Trudeau^b, Olivier Kah^c

^a *Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), Ribera de Gabanes s/n,
12595 Torre de la Sal, Castellón, Spain*

^b *Department of Biology, University of Ottawa, P.O. Box 4501, Stn. A, Ottawa,
Ontario, Canada K1N 6N5*

^c *Biologie Cellulaire et Reproduction, URA CNRS 256, Campus de Beaulieu,
35042 Rennes, Cedex, France*

Abstract

This study investigated the effects of testosterone (T) on the levels of immunoassayable salmon GnRH (sGnRH) in the brain and the pituitary in relation to blood plasma steroid levels and gonadal activity in juvenile male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L, < 1-year of age). Gonad-intact male fishes were intraperitoneally implanted for 76 days with silastic pellets containing no steroid (control) or testosterone (T; 100 µg body weight). The serum T response, the sGnRH content in whole brain and pituitary and the testicular development at 0, 15, 30 and 76 days following T implantation were assessed. Treatment with T did not significantly affect somatic growth or weight of gonads. However, gonad maturation was histologically more advanced in T-treated fishes compared to control fish. Histological examination showed that 15 days after implantation, 100% of steroid-treated fishes exhibited differentiated gonads, compared to only 50% of the controls. In addition, discrete spermiation was observed in 10% of the steroid-treated fishes 45 days after implantation while spermiation did not occur in the controls. Steroid treatment did not affect plasma oestradiol (E₂) levels and all animals exhibited similar basal levels (< 0.6 ng E₂/ml). Fifteen days after T-implantation, the sGnRH content of brain and pituitary and the plasma levels of T were elevated. Over the following weeks a progressive decrease in all these parameters was observed. A second implant of T provoked a new and significant ($p < 0.05$) rise of both plasma T and whole brain sGnRH content, indicating that the GnRH system was still responsive to the additional steroid administration. These results provide evidence of a positive feedback of steroids at the brain and/or pituitary level, indicating a possible participation of sex steroids in the acceleration of gonadal differentiation and stimulation of spermatogenesis in pre-pubertal sea bass. © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Testicular development; Sex steroids; sGnRH; Puberty; European sea bass; Teleost

Introduction

Gonadal steroids have been considered important feedback regulators of gonadotropin (GTH) release and many actions of aromatizable androgens are mediated by their localized conversion to oestradiol within the brain and pituitary by aromatase enzymes (Callard, 1983; Borg, 1994). Steroids, especially oestrogens, have both positive and negative feedback effects on the brain-pituitary-axis in fish (Peter, 1982, 1983). A positive feedback of steroids on GTH-II levels in the pituitary has been demonstrated in immature salmonids (Crim and Evans, 1983; Goos *et al.*, 1986), African catfish (Zandbergen, 1996) and in European eels (Dufour *et al.*, 1983) or by stimulation of GTH-II β -subunit gene expression in eels (Qu  rat *et al.*, 1991) suggesting that sex steroids could participate in the initiation of gonadal recrudescence or onset of puberty. However, in salmonids, GTH-I appears to be more important in the early stages of the reproductive cycle (Swanson, 1991). It has also been demonstrated that in sexually regressed goldfish, testosterone (T) through aromatization to oestrogen, is involved in a positive feedback regulation of GTH-II by potentiating the response to GnRH (Trudeau *et al.*, 1991a). This action could be mediated through the modulation of dopamine turnover in the goldfish (Trudeau *et al.*, 1991b), although in vitro studies in rainbow trout (Weil and Marcuzzi, 1990a,b) and goldfish (Trudeau *et al.*, 1993) have shown a direct effect of steroids on the pituitary responsiveness to GnRH. Xiong *et al.* (1994) provided a model of transcriptional regulation of GTH-II production suggesting how the sex steroids could enhance GnRH-stimulated GTH-II release. It has been shown that long-term T treatment has an effect on the development of hypothalamic GnRH activity in sexually-immature rainbow trout, platyfish and eel (Goos *et al.*, 1986; Schreibman *et al.*, 1986; Dufour *et al.*, 1989). Recently, Breton and Sambroni (1996) working in triploid rainbow trout showed that both T and E₂ induced a significant increase in GnRH content in pituitary and brain tissues. However, only T induced long-term increases in plasma GTH-II content. These studies suggest that both steroids may act on the synthesis and release of GnRH, with T having a greater influence on the control of GTH secretion, particularly at the end of the

reproductive cycle. Testosterone can stimulate GTH secretion in vivo, as well as increasing sGnRH brain and pituitary content, and pituitary GTH-II concentration. These studies suggest a predominant positive role for T in the control of GTH-II and possibly in GnRH synthesis and release.

The sea bass (*Dicentrarchus labrax* L), is a commercially important species and aspects of its reproductive physiology are well known (Carrillo *et al.*, 1995a,b). It is a gonochoristic species which attains puberty at 2 and 3 years of age in males and females, respectively. This reproductive strategy results in females, at the same age being generally larger than males. In addition, the sex ratio is skewed toward males (between 70 and 90%) under culture conditions (Carrillo *et al.*, 1995a). All of these aspects and particularly the recent results on sex control of this species (Zanuy *et al.*, 1994; Blázquez *et al.*, 1995; Colombo *et al.*, 1995; Felip *et al.*, 1997) suggest that controlling sex ratios, gonadal development or onset of puberty could lead to solutions for some of the problems in the aquaculture of this species. Despite the great interest in altering the time of puberty of many marine cultured species, including sea bass, the endocrine mechanism which regulates this process is largely unknown. Hence the aim of the present study was to provide information on the effects of T implants on the levels of brain and pituitary GnRH and correlate them with plasma levels of steroids and gonadal activity in pre-pubertal male sea bass.

Materials and methods

Animals

European sea bass weighing 2-3 g were purchased from a commercial supplier (Tinamenor) and reared at the Torre de la Sal facilities (40° latitude North) until 40 g in weight. Prior to experimentation, 108 fishes were evenly distributed in two tanks of 500 l capacity and maintained under natural photoperiod and temperature. All animals were fed once a day at 1000 h with sea bass pellets (EWOS). Only males were considered in this study which were pre-pubertal and undifferentiated at this age (< 1 year, Blázquez *et*

al., 1998). The experiment was initiated in November and ended in January. During this period, there was a marked reduction of somatic growth as result of decreasing seawater temperatures which attain minimum values of around 12°C at the end of the year (Zanuy and Carrillo, 1985).

Steroid treatment

Solid silastic pellets containing 0 (controls) or 100 mg/g of T were manufactured as previously described (Trudeau *et al.*, 1991a). Fishes received a T dose of 100 µg/g body weight. Under 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222, Sigma) anaesthesia (100 ppm), pellets were implanted i.p. through a 2-3 mm incision in the body wall. Dental cement mixed with antibiotic (chloramphenicol was used after incision and baths of 100 ppm furazolidone 1 h daily for a week were used to prevent infections.

Experimental protocols

After 56 days of treatment, half of the animals from the control or T implanted groups, received second implants without and with T, respectively. At various times of experimentation (0, 15, 30 and 76 days after first implantation), body weight (bw) and length (*L*) were recorded from anaesthetized fish and blood samples taken by caudal puncture between 1100 h-1200 h. bw, *L*, condition factor (CF) expressed as: $\text{bw (g)/}L \text{ (cm)}^3 \times 100$ and gonadosomatic index (°GSI) expressed as: $\text{gonad weight (g)/bw (g)} \times 100$ values, were determined for steroid implanted and control sea bass. Serum was collected and frozen (-20°C) until hormone analysis. Fifteen fishes from each of the control and implanted groups were sacrificed after blood sampling. The whole brains and pituitaries were rapidly dissected, weighed, and fast frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further determination of the sGnRH content. Gonads were also removed and fixed in Bouin-Hollande, blocked in paraffin and 7 µm sections stained with the Cleveland-Wolf (C-W) technique (Herland, 1960) for histological analysis.

EIA and RIA

GnRH was extracted with heated acetic acid (80°C) followed by sonication and centrifugation as previously described (Kah *et al.*, 1994). Whole brain and pituitary sGnRH concentrations were determined by a sensitive competitive enzyme-immunoassay (EIA) for sGnRH developed and validated by Kah *et al.* (1994). To determine any possible cross-reactivity with the recently discovered sea bream GnRH form (sbGnRH) (Powell *et al.*, 1994), sbGnRH and sGnRH standard curves were also performed. sbGnRH was obtained from the Laboratoire de Cristallographie et des Physique Cristalline (Univ. Bordeaux I URA 144 CNRS, France) and purity tested in a C-18 HPLC column (Waters). sGnRH was purchased from Sigma (St. Louis, MO). Fig. 1A illustrates the displacement curves obtained from standards of sGnRH and sbGnRH, while the linearization of the displacement curves is shown in Fig. 1B. The non-parallelism of the standard curves of sGnRH and sbGnRH demonstrate that sbGnRH form was not recognized by sGnRH antibodies in the same way as the sGnRH form sharing only a 0.02% cross reactivity at the 50% Bi/Bo level. In turn, antibodies against sGnRH and displacement curves generated by dilutions of brain and pituitary extracts were the same as those described by Kah *et al.* (1994). This confirms that serial dilutions of sea bass brain/pituitary extracts behave in a parallel fashion in the sGnRH assay. It is therefore reasonable to assume that the GnRH measured in sea bass mainly corresponds to sGnRH. The sensitivity of the assay was 2 pg/well (B/Bo 80%).

T and 17 β -oestradiol (E₂) were determined by RIA after a cyclohexane:ethylacetate mixture (1:1, v/v) extraction according to Prat *et al.* (1990). Assay sensitivity for T, and E₂ ranged from 20 to 40 pg/tube, and 5 to 10 pg/tube, respectively.

Testicular histology

The testicular structure of sea bass is considered lobular (for review, see Billard *et al.*, 1982), in which, connective tissue extends from the testicular capsule to form lobules

lined with a Sertoli cell epithelium including germ cells. Five stages of testicular development were recognized.

Stage I (undifferentiated gonads)

The gonads were composed of somatic elements such as epithelial cells, fibroblasts, collagen fibers and blood vessels, with isolated germ cells irregularly dispersed, particularly throughout the periphery of the gland (Fig. 2A).

Stage II (early differentiated testes)

Early signs of anatomical and cytological testicular differentiation were detectable, including initial formation of seminiferous lobules and differentiation of spermatogonia from parent germ cells (Fig. 2B). 2.5.3.

Stage III (immature differentiated testes)

A clear lobular pattern of the testis was recognized. Cysts containing spermatogonia are distributed close to the lobe periphery and an empty and wide lobular lumen is found (Fig. 2C).

Stage IV (early maturing testis)

Lobular size increased considerably in this stage. Cysts containing primary spermatocyte indicated that germ cells have entered the first meiotic division (Fig. 2D).

Stage V (maturing testis)

Cysts contained all stages of development of germinal cells including secondary spermatocytes, spermatids and some spermatozoa indicating that discrete spermiation was initiated (Fig. 2E).

Statistics

The results are expressed as mean \pm standard error and data were analyzed using the One-way Analysis of Variance (ANOVA). Normality was ensured after logarithmic transformation of the data, as required, and Bartlett's test was used to verify homogeneity of variances (Sokal and Rolf, 1981). Tukey's HSD test was used for multiple comparisons. When logarithmic transformation of data did not ensure normality of

variances, the non-parametric Kruskal-Wallis test was used to determine differences between groups. Frequency distribution of testicular classes was analyzed using Chi square analysis of contingency tables. In all cases, differences were acceptable at $p < 0.05$.

Results

Growth

There was no significant growth during the entire period of experimentation in either control or T treated fish. At the beginning of treatment, bw, L and CF were 42.60 ± 1.92 g; 14.17 ± 0.150 cm and 1.482 ± 0.0353 , respectively. However, after 77 days of treatment there were no significant changes respectively in bw, L or CF of either control (41.50 ± 1.59 g; 14.62 ± 0.17 cm and 1.33 ± 0.020 or implanted fishes (41.48 ± 1.51 g; 14.78 ± 0.18 cm and 1.28 ± 0.02). 3.2.

Gonadal development

Control fishes exhibited undeveloped, thread-like gonads throughout the entire experimental period; GSIs for control fishes at the beginning and at the end of treatment were $0.016 \pm 0.004\%$ and $0.02 \pm 0.01\%$ respectively. Treatment with T did not affect GSI irrespective of the time of experimentation; GSIs of T implanted fish at the end of the treatment were $0.03 \pm 0.01\%$.

In sham-implanted fishes, stages I and II dominated although a higher frequency of Stage 11 was observed in fishes sacrificed at a later time during the experiment. However, more developed gonadal stages were not observed in this group of animals (Fig. 3). T-implanted fishes exhibited significantly more advanced stages of testicular development than the control group including stages II, III, IV and V (Fig. 3). In general, fishes which have been implanted for longer periods of time showed more mature testes than those observed at earlier stages of treatment. Animals receiving two implants

showed similar stages of gonadal development to those receiving one implant at the same time, however, a tendency to reduce the proportions of stage III in favour of stage IV of gonadal development was observed in those animals (Fig. 3, bottom).

Plasma hormone levels

The effects of steroid implantation on plasma E₂ and T are shown in Fig. 4. In T-implanted fish, plasma levels of E₂ were not significantly elevated compared to controls. Basal levels (below 0.6 ng/ml) of E₂ were observed in all groups (Fig. 4A). Low levels of plasma T (2.6-5.9 ng/ml) were detected in control fishes. No significant change in plasma T was found in control fishes during the first 15 days of treatment. However, after 30 days, a discrete but significant ($p < 0.05$) elevation of plasma T occurred which was maintained until 76 days corresponding to the end of experimentation (Fig. 4B). Treatment with T provoked a dramatic increase of plasma T levels 15 days after implantation (43.9 ± 3.87 ng/ml), i.e., around 17 times greater than controls. On the following samplings (30 and 75 days after implantation), a steady and significant decrease ($p < 0.05$) of plasma T levels was observed. Despite this decrease, all values were significantly higher ($p < 0.05$) than the corresponding control groups. In fishes receiving a second T implant, a new and significant ($p < 0.05$) rise of plasma T was observed achieving peak values of 31.1 ± 3.67 ng/ml (Fig. 4B).

Pituitary and brain sGnRH content

Pituitary sGnRH content remained constant (0.61-0.69 ng/mg) in control fishes sacrificed 0, 15, 30 or 76 days after implantation (Fig. 5A). However, in T-implanted fish, sGnRH content in the pituitary was significantly higher ($p < 0.05$) than in the respective control group 15 days after implantation, reaching levels of 1.08 ± 0.125 ng/mg (Fig. 5A). Over the following days, a steady decrease in sGnRH pituitary content was observed in T-implanted fish; these levels were significantly lower ($p < 0.05$) than those of the control group. They were also the lowest values recorded over the entire experiment ($0.296 \pm$

0.0411 ng/mg). The effects of the second T implantation did not result in an increase of the sGnRH content in the pituitary gland with respect to the single T implantation group (Fig. 5A). Brain sGnRH content remained constant in controls, except in those animals sacrificed at IS days after implantation where levels were significantly lower ($p < 0.05$) (Fig. 5B). At this time, the sGnRH content in the brain of T-treated males was significantly higher ($p < 0.05$) than in the corresponding controls. Following implantation, a steady and significant decrease of sGnRH content in the brain was observed ($p < 0.05$). Minimum values occurred at 76 days after T implantation which were significantly lower than the corresponding control group. Administration of a second implant induced a new significant rise of sGnRH content in the brain of sea bass as compared to fish receiving a single T implant.

Discussion

The results of this study demonstrate that implantation of T, a naturally occurring aromatizable androgen, can accelerate gonadal differentiation and stimulate spermatogenesis in pre-pubertal sea bass.

The experiment was performed from November to January, a period of time in which growth of sea bass under natural photoperiod and temperature is very low (Zanuy and Carrillo, 1985). Fish length at the beginning of the experiment ranged between 13 and 16 cm and had undifferentiated or early differentiated male gonads. This is consistent with previous data of Blázquez *et al.* (1998) showing that male sex differentiation in juvenile sea bass takes place at body lengths ranging from 12.8 to 14.2 cm. Seasonal changes of plasma gonadal steroids and dietary influences on these have been described in adult male sea bass (2-3 years old, 0.3-1 kg bw), showing a surge of plasma T levels during November, and peaks in December and January, which correspond to the maturation period of males (Prat *et al.*, 1990; Kah *et al.*, 1994; Cerdá *et al.*, 1997). Results obtained in this experiment with juvenile male sea bass, demonstrated similar values of plasma T in control fish sampled during this period. Despite the high levels of

plasma T observed in these fish, they had undifferentiated or early differentiated testes, containing only isolated spermatogonia (stage 11) and no advanced stages of testicular development. The present results show a dramatic reduction in number of undifferentiated fish in the second half of this period correlated with a significant rise of plasma T that is maintained until the end of the experiment. Taken together these results suggest that differentiation of the gonad is necessary before advancement to other stages of development. It has been postulated that steroids may be the natural inducers of gonadal sex differentiation in fish (Yamamoto, 1969) and that the ability of the gonads to synthesize androgens and oestrogens from precursors does not occur until after gonadal differentiation taking place (Van den Hurk, 1982). Thus, it is reasonable to assume that the significant rise of plasma T observed in control animals between days 15 and 30 could be associated with the completion of sex differentiation in the male sea bass.

After 15 days of T implantation in fish, T plasma levels increased approximately 10-fold relative to those in control animals. These levels remained significantly elevated for 2.5 months, despite a steady decrease of plasma T levels in the days following the initial peak. These results demonstrate the effectiveness of implants in the maintenance of elevated plasma levels of T at least for 76 days. In these animals advanced stages of gonadal development were observed, suggesting that T, when provided at high doses, not only could accelerate gonadal differentiation but also could induce spermatogenesis. These effects may be the consequence of a direct effect of T on the gonad as has been observed in other teleost species (Miura *et al.*, 1991; Fitzpatrick *et al.*, 1993). However, there is also the possibility that induction of maturation is mediated through the action of T and or its metabolites at the brain-pituitary level. The present results support this contention for a significant increase of sGnRH levels in both pituitary and brain was observed in T implanted fishes after 15 days of treatment. These results suggest a positive feedback of gonadal steroids at the brain and/or pituitary level of immature sea bass. Amano *et al.* (1993) found that hypothalamic sGnRH and plasma levels of T and IKT were significantly higher in precocious males than in immature males, providing further evidence of a positive feedback of steroid hormones in accordance with the present

results. In addition, a progressive decrease of sGnRH content was observed following T implantation with significantly lower sGnRH contents at the end of treatment. This significant reduction in sGnRH content paralleled the gonadal maturation of sea bass. Unfortunately, at the time when this experiment was performed, a specific assay for sea bass GTH was not available. However, Sorbera *et al.* (1997), working with pituitary primary cell cultures of sea bass, observed a positive influence of long-term T exposure on sGnRH-stimulated GTH-II release. Yu *et al.* (1991) showed that male goldfish, had a reduced brain sGnRH levels in association with increases in serum GTH, suggesting that sGnRH release could induce the gonadotropic surge. Kah *et al.* (1994) demonstrated a significant decrease of brain and pituitary sGnRH during the spawning period of male sea bass and return to normal values during the post-spawning period. Taking into account these results, it is likely that a possible release of GTH from the pituitary gland could be produced during this time to induce precocious gonadal maturation of sea bass. These data suggest that T participates in the mechanism which triggers puberty, possibly at a central level, by affecting GnRH synthesis and release as has been suggested in other teleosts (Crim and Evans, 1983; Dufour *et al.*, 1983, 1989; Goos *et al.*, 1986; Schreibman *et al.*, 1986; Quérat *et al.*, 1991; Trudeau *et al.*, 1991a). The mechanism of action of T in the sea bass is unknown and although no significant changes were observed in plasma E₂ levels of T treated animals, its action mediated through aromatization to oestrogen cannot be ignored. Sex steroid treatment, has been shown to increase brain GnRH levels in juvenile trout (Goos *et al.*, 1986), platyfish (Schreibman *et al.*, 1986), European silver eel (Dufour *et al.*, 1985) and in addition, sex steroids increase GnRH mRNA expression in the brain of masu salmon (Amano *et al.*, 1994). Since estrogens receptors (ER) have not been visualized on GnRH neurons, these enhancing effects of sex steroids in GnRH production could be indirect, via other neuronal systems, such as dopamine, aminobutyric acid and neuropeptide Y synthesizing neurons (Trudeau, 1997). Moreover the fact that no ER could be seen in GnRH neurons of rainbow trout (Navas *et al.*, 1995), does not exclude the possibility that androgen receptors may be present in those cells, which is unknown at this stage.

Although sbGnRH is the predominant form in mature male and female gilthead seabream, sGnRH is also present in the hypophysis (Powell *et al.*, 1994). Taking into account, that the potency of sGnRH is higher than that of sbGnRH in the release of GTH-II (Sorbera *et al.*, 1997), there is still the possibility for the low levels of sGnRH assayed to be physiologically significant. Furthermore, it is known that high levels of sbGnRH and low levels of sGnRH are present in the pituitary of mature perciforms (Powell *et al.*, 1994) but nothing is known about the ontogeny or ratios of these GnRH forms in immature animals. Thus, differences may exist between immature and mature animals.

In summary, the present findings demonstrate that sustained administration of testosterone to pre-pubertal male sea bass, stimulated increases in sGnRH content at the level of both the pituitary and the brain. The observed changes in sGnRH were correlated with an acceleration of sexual differentiation in males since a higher frequency of advanced stages of gonadal development was observed. This suggests that T may be involved in the onset of puberty of sea bass probably acting via a positive feedback in GnRH.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Lisa Sorbera and Dr. José A. Muñoz Cueto for their valuable suggestions and comments on the manuscript. Work was supported by a CICYT grant number AGF 93-0127 to S.Z. and by a Cooperation agreement CSIC CNRS. J.M. was supported by a scholarship of the MEC. sbGnRH was kindly donated by Dr. José A. Muñoz Cueto (Univ. Cádiz, Spain).

References

- Amano, M., Aida, K., Okumoto, N., Hasegawa, Y., 1993. Changes in levels of GnRH in the brain and pituitary and GTH in the pituitary in male masu salmon, (*Onchorhynchus masou*), from hatching to maturation. *Fish Physiol. Biochem.* 11, 233-240.



- Amano, M., Hyodo, S., Urano, A., Okumoto, N., Kitamura, S., Ikuta, K., Susuki, Y., Aida, K., 1994. Activation of salmon gonadotropin-releasing hormone synthesis by 17-alpha-methyltestosterone administration in yearling masu salmon, *Onchorinchus masou*. Gen. Comp. Endocrinol. 95, 374-380.
- Borg, B., 1994. Androgens in teleost fishes. mini review. Comp. Biochem. Physiology. 109C, 219-245.
- Billard, R, Fostier, A., Weil, c., Breton, B., 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39, 65-79.
- Callard, G.V., 1983. Androgen and estrogen actions in the vertebrate brain. Am. Zool. 23, 607-620.
- Blázquez, M., Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., Donaldson, E.M., 1995. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L) aquaculture: effects of dietary 17 ex-methyl- testosterone prior to sex differentiation. Aquaculture 135, 329-342.
- Blázquez, M., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F., 1998. Effects of rearing temperatures on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). 1. Exp. Zool. 281, 207-216.
- Breton, B., Sambroni, E., 1996. Steroid activation of the brain-pituitary complex gonadotropic function in the triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 101, 155-164.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Cerdá, J., Ramos, J., Mañanós, E., Bromage, N., 1995a. Sea bass. In: Bromage, N.R, Roberts, J. (Eds.), Broodstock Management and Egg and Larval Quality. Blackwell Science, London, pp. 138-168.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Cerdá, J., Mañanós, B., Bromage, N., Ramos, J., Kah, O., 1995b. Nutritional and photoperiodic effects on hormonal cycles and quality of spawning in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). Neth. J. Zool. 45 (1-2), 204-209.
- Cerdá, J., Zanuy, S., Carrillo, M., 1997. Evidence for dietary effects on plasma levels of sexual steroids during spermatogenesis in the sea bass. Aquacult. Int. 5, 473-477.
- Colombo, L, Barbaro, A, Libertini, A., Benedetti, P., Francescon, A., Lombardo, I,

1995. Artificial fertilization and induction of triploidy and meiogynogenesis in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *J. Appl. Ichthyol.* 11, 118-125.
- 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.
- Dufour, S., DeIerue-le Belle, N., Fontaine, Y.A., 1983. Effects of steroid hormones on pituitary immunoreactive gonadotropin in European freshwater eel, *Anguilla anguilla* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 52, 190-197.
- Dufour, S., Fontaine, Y.A., Kerdelhue, B., 1985. Increase in brain and pituitary radioimmunoassayable gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the European silver eel treated with sexual steroid or human chorionic gonadotropin. *Neuropeptides* 6, 495-502.
- Dufour, S., Le Belle, N., Baloche, S., Fontaine, Y.A., 1989. Positive feedback control by the gonads on gonadotropin (GTH) and gonadoliberin (GnRH) levels in experimentally matured female silver eels, *Anguilla anguilla* L. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 157-162.
- Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Martínez, G., Ramos, J., Piferrer, F., 1997. Optimal conditions for the induction of triploidy in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). *Aquaculture* 152, 287-298.
- Fitzpatrick, M.S., Pereira, C.B., Schreck, C.B., 1993. In vitro steroid secretion during early development of mono-sex rainbow trout: sex differences, onset of pituitary control, and effects of dietary steroid treatment. *Gen. Comp. Endocrinol.* 91, 199-215.
- Goos, H.J.Th., de Leeuw, R., Cook, H., Van Oordt, P.G.W.J., 1986. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) bioactivity in the brain of the immature rainbow trout, *Salmo gairdnerii*: the effect of testosterone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64, 80-84.
- Herland, M., 1960. Étude critique de deux techniques nouvelles afin de mettre en évidence les différentes catégories cellulaires présentes dans la glande pituitaire. *Bull. Microsc. Appl.* 10, 37-44.

- Kah, O., Zanuy, S., Pradelles, P., Cerdá, J., Carrillo, M., 1994. An enzyme immunoassay for salmon gonadotropin-releasing hormone and its application to the study of the effects of diet on brain and pituitary GnRH in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Gen. Comp. Endocrinol. 95, 464-474.
- Miura, T., Yamauchi, K., Nagahama, Y., Takahashi, H., 1991. Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. Zool. Sci. 8, 63-73.
- Navas, J.M., Anglade, I., Bailhache, T., Pakdel, F., Breton, B., Jégo, P., Kah, O., 1995. Do gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptors in the rainbow trout? A double immunohistochemical study. J. Comp. Neurol. 362, 1-14.
- Peter, R.E., 1982. Nature, localization and actions of neurohormones regulating gonadotropin secretion in teleosts. In: Richter, C.J.J., Goos, H.T.Th. (Eds.), Reproductive Physiology of Fish. Pudoc, Wageningen, The Netherlands, pp. 30-39.
- Peter, R.E., 1983. The brain and neurohormones in teleost reproduction. In: Hoar, E.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), Fish Physiology. Academic Press, New York, pp. 97-135.
- Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M., De Mones, A., Fostier, A., 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids in sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. Gen. Comp. Endocrinol. 78, 361-373.
- Powell, J.F.F., Zohar, Y., Elizur, A., Park, C., Fisher, W.H., Craig, A.G., Rivier, J.E., Lovejoy, D.A., Sherwood, N.M., 1994. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brain of one species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12081-12085.
- Quérat, B., Hardy, A., Fontaine, Y.A., 1991. Regulation of the type II gonadotropin alpha-subunit and beta-sub-unit messenger-RNAs by estradiol and testosterone in the European eel. J. Mol. Endocrinol. 7, 81-86.
- Schreibman, M.P., Margolis-Nunno, H., Halpern-Sebold, L.R., Goos, H.J.Th., Perlman, P.W., 1986. The influence of androgen administration on the structure and function of

- the brain-pituitary-gonad axis of sexually immature platyfish, *Xiphophorus maculatus*. Cell Tissue Res. 245, 519-524.
- Sokal, RR, Rolf, F.J. 1981. Biometry: The Principles and Practices of Statistics in Biological Research, 2nd edn. W.H. Freeman, New York, pp. 859.
- Sorbera, L, Zanuy, S., Carrillo, M. 1997. Gonadotropin-releasing hormone action sea bass (*Dicentrarchus labrax*) pituitary primary cell cultures. In: Proc. Third Intern. Symp. on Research for Aquaculture: Fundamental and Applied Aspects. August 24-27. Univ. Barcelona, Spain.
- Swanson, P. 1991. Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. (Eds.), Proc. Fourth Inter. Symp. Rep. Physiol. Fish. Pub. Fish Symp 91, Sheffield, UK, pp. 1-7.
- Trudeau, V.L, 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. Rev. Reprod. 2, 55-68.
- Trudeau, V.L, Peter, RE., Sloley, B.D., 1991a. Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish. Bio! Reprod. 44, 951-960.
- Trudeau, V.L, Sloley, B.D., Wong, A.O.L, Peter, R.E., 1991b. Interactions of gonadal steroids with brain dopamine (DA) and gonadotropin-releasing hormone in the control of gonadotropin-II secretion in the goldfish. Gen. Comp. Endocrinol. 89, 39-50.
- Trudeau, V.L, Murthy, C.K, Habibi, H.R, Sloley, B.D., Peter, RE., 1993. Effects of sex steroid treatments on gonadotropin-releasing hormone stimulated gonadotropin secretion from the goldfish pituitary. Bio! Reprod. 48, 300-307.
- Van den Hurk, R, 1982. Effects of steroids on gonadotropic (GTH) cells in the pituitary of rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, shortly after hatching. Cell Tissue Res. 224, 361-368.
- Weil, c., Marcuzzi, O., 1990a. Cultured pituitary cell response to GnRH at different stages of rainbow trout oogenesis and influence of steroid hormones. Gen. Comp. Endocrinol. 79, 483-491.

- Weil, C., Marcuzzi, O., 1990b. Cultured pituitary cell response to GnRH at different stages of rainbow trout spermatogenesis and influence of steroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 492-498.
- Xiong, F., Liu, D., Elsholth, H.P., Hew, C.L., 1994. The chinook salmon gonadotropin II beta subunit gene contains a strong minimal promoter with a proximal negative element. *Mol. Endocrinol.* 8, 771-781.
- Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds.), *Physiology*. Academic Press, New York, pp. 117-175.
- Yu, K.L., Peng, C., Peter, R.E., 1991. Changes in brain levels of gonadotropin-releasing hormone and serum levels of gonadotropin and growth hormone in goldfish during spawning. *Can. J. Zool.* 69, 182-188.
- Zandbergen, M.A., 1996. One gonadotropic cell type and two gonadotropin-releasing hormone systems in the african catfish, *Clarias gariepinus*: a morphological study. PhD Thesis, Utrecht, the Netherlands.
- Zanuy, S., Carrillo, M., 1985. Annual cycles of growth, feeding rate, gross conversion efficiency and hematocrit levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L) adapted to two different osmotic media. *Aquaculture* 44, 11-25.
- Zanuy, S., Carrillo, M., Blázquez, M., Ramos, J., Piferrer, P., Donaldson, E.M., 1994. Production of monosex and sterile sea bass by hormonal and genetic approaches. *Publ. Assoc. Dévelop. Aquac.* 119, 409-423.

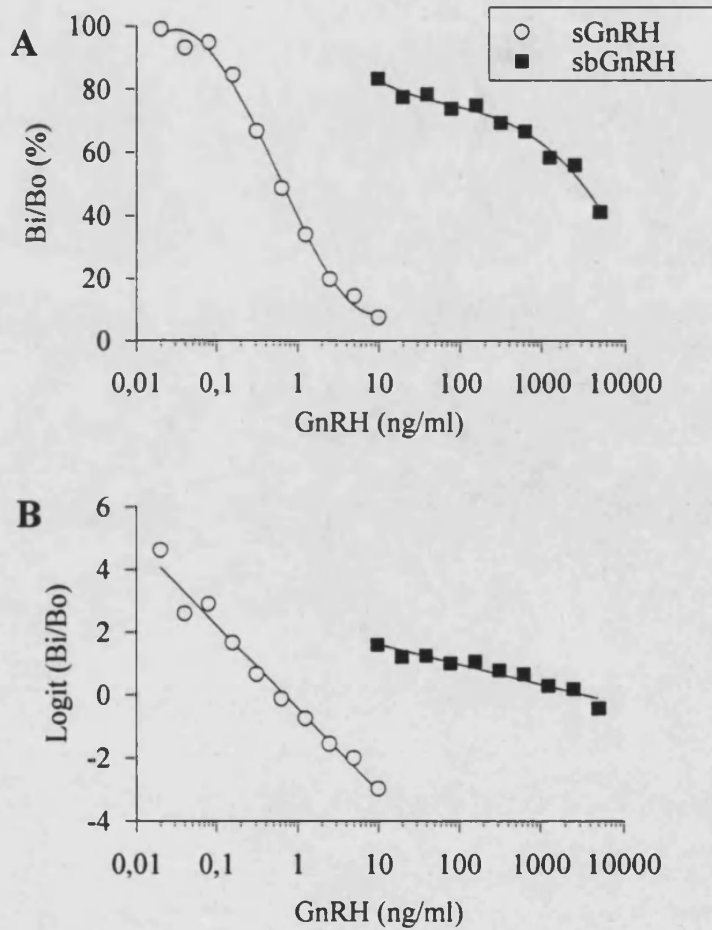


Fig. 1.

Parallelism of the curves for both sGnRH and sbGnRH. (A) Cross reactivity between sGnRH standard (O) and sbGnRH standard (■). Binding curves were obtained using 1 UE/ml of tracer and 1:75,000 antibody dilution in both cases. (B) Logit transformations of binding curves shown in (A).

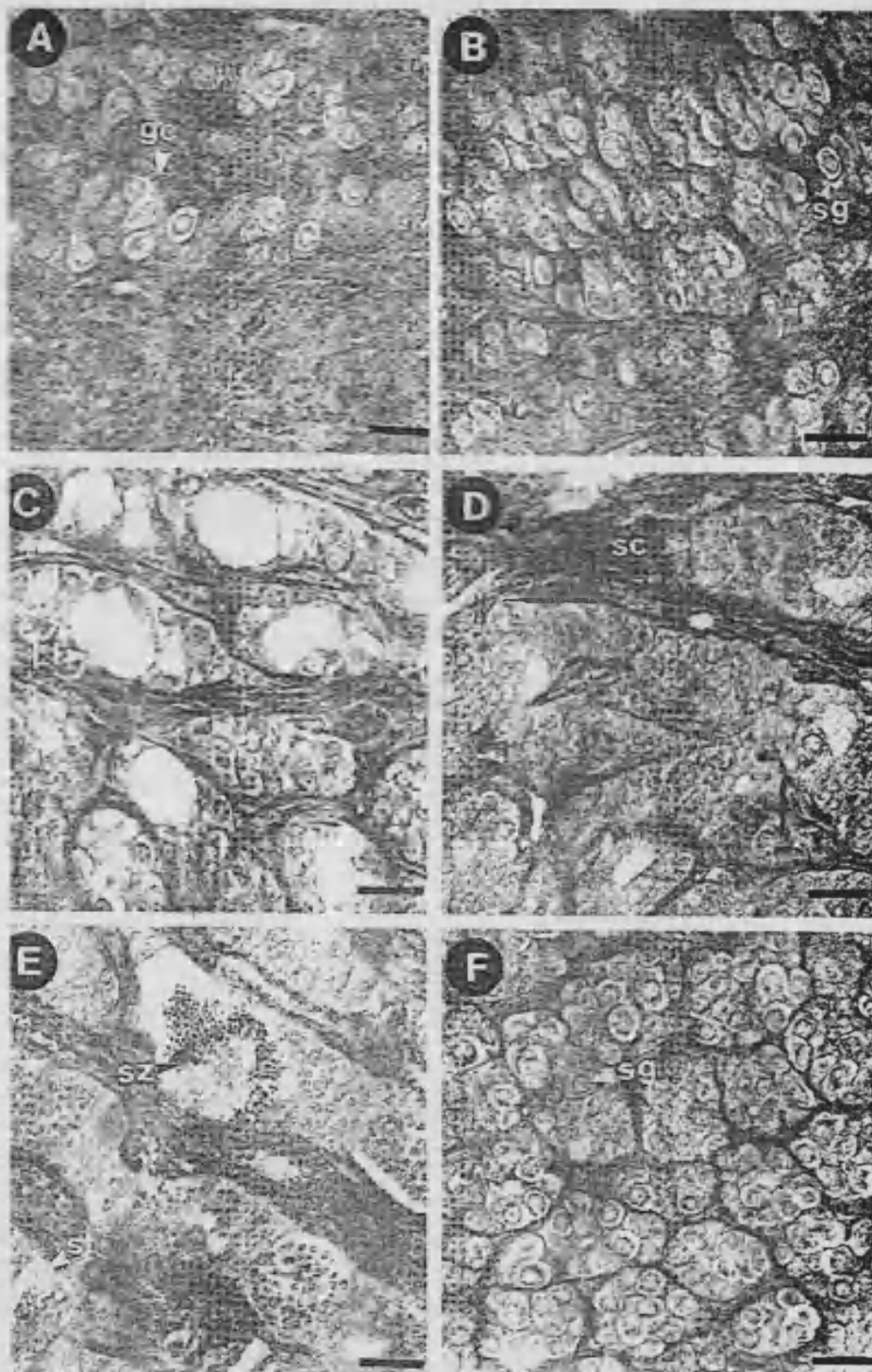


Fig. 2.

Testicular morphology and stages of testicular development observed in controls and T implanted less than 1-year-old male sea bass. (A) Stage I, undifferentiated gonads. (B) Stage II, early differentiated testis. (C) Stage III, immature differentiated testis. (D) Stage IV, early maturing testis. (E) Stage V, maturing testis. (F) Testis of a control male 76 days post-treatment. Ll = Lobular lumen. gc = Germinal cells. sg = Spermatogonium. sc = Spermatocyte. st = Spermatid. sz = Spermatozoa. Horizontal bar = 25 μ m. Cleveland- Wolf.

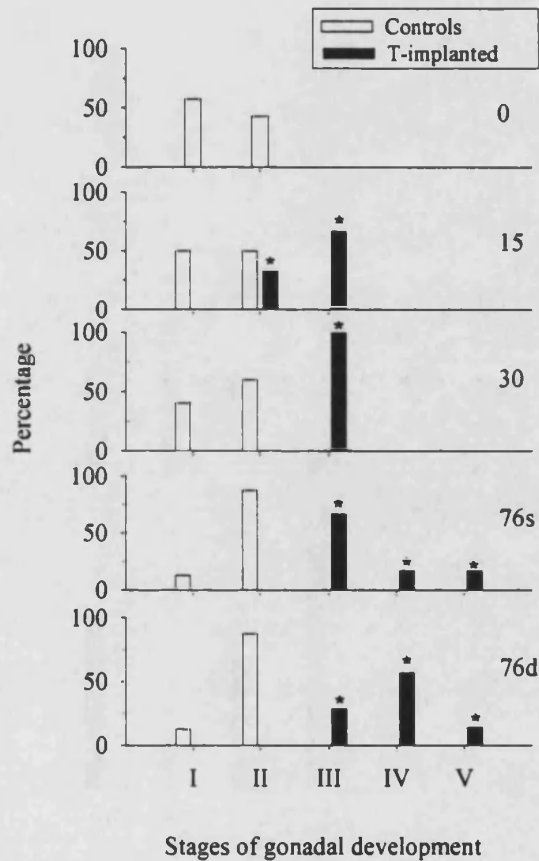


Fig. 3.

Stages of testicular development in controls (sham implanted) and T implanted less than 1-year-old male sea bass, after 0, 15, 30 and 76 days of treatment. Data are represented as the mean percentage of each stage of testicular development observed in 7-15 animals. Numbers in the insert indicate days after implantation. s = one implant, d = two implants. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$; Chi-square analysis of contingency tables) between control and treated fish at different sampling times.

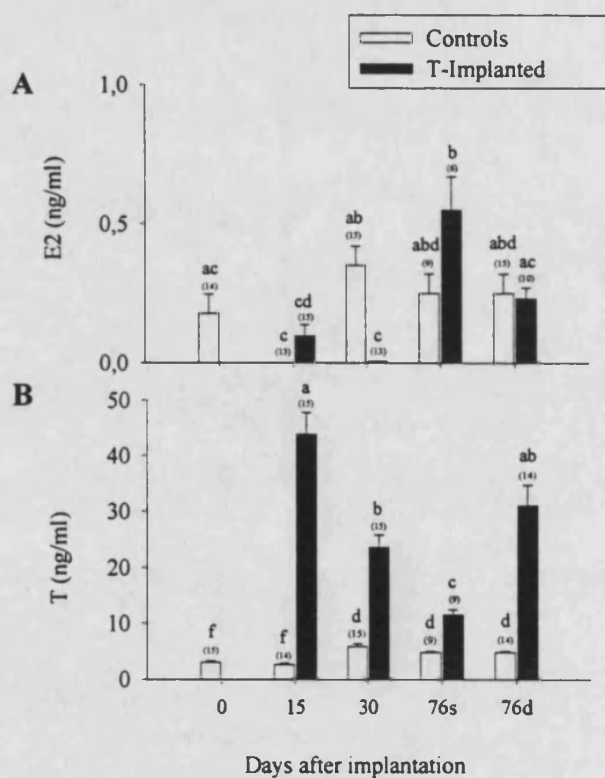


Fig. 4.

Observed plasma levels of E₂ (A) and T (B) in male sea bass, at 0, 15, 30 and 76 days after implant administration. Data represent mean ± SEM. Different letter(s) above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$, ANOVA; Tukey's HSD) between treatments and sampling times. Numbers in brackets indicate number of animals. s = one implant, d = two implants.

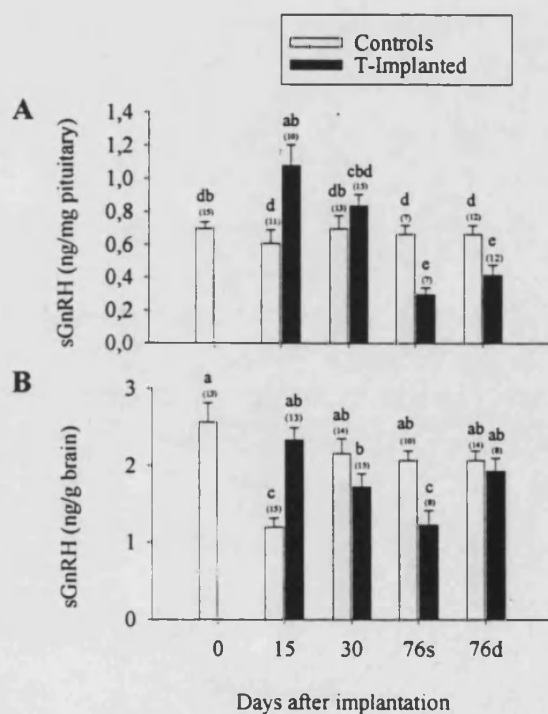


Fig. 5.

Observed pituitary (ng/mg pituitary) (A) and brain (ng/g brain) (B) sGnRH levels in male sea bass, at 0, 15, 30 and 76 days after implant administration. Data represent mean \pm SEM. Different letter(s) above the bars indicate significant differences ($p < 0.05$, ANOVA; Tukey's HSD) between treatments and sampling times. Numbers in brackets indicate number of animals. s = one implant. d = two implants.

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

Jorge Mateos, Evaristo Mañanós, Manuel Carrillo, Silvia Zanuy

*Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (C.S.I.C.), Ribera de Cabanes s/n,
12595 Torre la Sal, Castellón, Spain*

Abstract

The secretion of gonadotropins, the key reproductive hormones in vertebrates, is controlled from the brain by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH), but also by complex steroid feedback mechanisms. In this study, after the recent cloning of the three gonadotropin subunits of sea bass (*Dicentrarchus labrax*), we aimed at investigating the effects of GnRH and sexual steroids on pituitary gonadotropin mRNA levels, in this valuable aquaculture fish species. Implantation of sea bass, in the period of sexual resting, for 12 days with estradiol (E₂), testosterone (T) or the non aromatizable androgen dihydrotestosterone (DHT), almost suppressed basal expression of FSH β (four to 15-fold inhibition from control levels), while slightly increasing that of α (1.5-fold) and LH β (approx. twofold) subunits. Further injection with a GnRH analogue (15 mg/kg BW; [D-Ala⁶, Pro⁹-Net]-mGnRH), had no effect on FSH β mRNA levels, but stimulated (twofold) pituitary α and LH β mRNA levels in sham- and T-implanted fish, and slightly in E₂- and DHT-implanted fish (approx. 1.5-fold). The GnRH_a injection, as expected, elevated plasma LH levels with a parallel decrease on LH pituitary content, with no differences between implanted fish. In conclusion, high circulating steroid levels seems to exert different action on gonadotropin secretion, inhibiting FSH while stimulating LH synthesis. In these experimental conditions, the GnRH_a stimulate LH synthesis and release, but have no effect on FSH synthesis. © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Gonadotropin; Follicle-stimulating hormone; Luteinizing hormone; Gonadotropin-releasing hormone; Steroids; Gene expression; mRNA levels; Sea bass; Fish

Introduction

The pituitary gonadotropins (GTHs), follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), are the key hormones in the control of reproduction in vertebrates, regulating gonadal gametogenesis and steroidogenesis. The FSH is involved in the initiation of gametogenesis and regulation of gonadal growth, whereas LH mainly regulates gonadal maturation and spermiation/ovulation. They are complex heterodimeric glycoproteins, consisting of a common α subunit and a hormone-specific β subunit, encoded by different genes. Both subunits bind non-covalently into the gonadotropic cell, to form the biologically active dimeric hormone (Pierce, 1988). For many years, it was believed that the pituitary of fish contained a single gonadotropin, called maturational gonadotropin, which regulated all processes of reproduction (Burzawa-Gerard, 1982). In the late 1980s, works on salmonid species established the duality of fish GTHs, with the discovery of a new gonadotropin, called GTH-1, chemically different from the previously known maturational gonadotropin, now called GTH-2 (Kawauchi *et al.*, 1989). Based on nucleic acid and amino acid sequence analysis, fish GTH-1 and GTH-2 were homologous to tetrapod FSH and LH, respectively (Quérat, 1994). Further biological evidence has reinforced this homology. In salmonid fish, plasma GTH-1 (FSH-like) levels are high during the early stages of gametogenesis, decreasing during vitellogenesis and maturation and rising again at the preovulatory period, whereas those of GTH-2 (LH-like) are undetectable during gametogenesis, increasing just before spermiation/ovulation (Swanson, 1991; Slater *et al.*, 1994; Prat *et al.*, 1996; Breton *et al.*, 1998; Bon *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 1999; Vacher *et al.*, 2000). Annual profiles of gene expression reflected those of plasma levels (Weil *et al.*, 1995; Gómez *et al.*, 1999) and further implicate GTH-1 (FSH-like) in the control of initiation and maintenance of gonadal growth, whereas GTH-2 (LH-like) would regulate final gonadal maturation and spermiation/ovulation, at least in salmonids. These different temporal expression patterns suggest different functions for each hormone, but also different mechanisms regulating their synthesis and release. For several years, a good deal of knowledge has been

accumulated on the regulation of LH secretion in fish (Trudeau, 1997), but very little is known about FSH in fish, and is normally restricted to salmonid species.

The secretion of gonadotropins from the pituitary is controlled from the brain by the neuropeptide gonadotropin-releasing hormone (GnRH). The stimulatory action of GnRH on LH release has been investigated in many fish species (Breton *et al.*, 1993), while only some reports suggest that FSH release may also be stimulated by GnRH (Breton *et al.*, 1998; Mañanós *et al.*, 1999; Dickey and Swanson, 2000). Recent studies have shown that GnRH may also stimulate LH and FSH gene expression (Khakoo *et al.*, 1994; Melamed *et al.*, 1998; Dickey and Swanson, 2000), although the effects are dependent on the species and the reproductive stage of the fish. In addition to the neuronal inputs from the brain, gonadotropin secretion is controlled by steroidal feedback mechanisms. Steroid action is exerted through binding to specific intra-cellular receptors that act as ligand-dependent transcription factors, to regulate the transcription rate of target genes (Beato *et al.*, 1995). The presence of estrogen receptors (ER) has been demonstrated in gonadotropic cells of the pituitary and, in the brain, in neuronal systems known to influence the GnRH/GTH function, such as dopamine, NPY and GABA (Kah *et al.*, 1997).

Positive steroid feedback in fish have been evidenced by several studies, showing that long term steroid treatment of immature fish increases LH pituitary content and stimulates basal and GnRH-induced LH release (Crim and Evans, 1979, 1980; Dufour *et al.*, 1983; Breton *et al.*, 1997), as well as pituitary α and LH β mRNA levels (Counis *et al.*, 1987; Dickey and Swanson, 1998). Studies in mammals indicate that the positive action of steroids is mainly exerted directly to the pituitary, by acting on the gonadotropin genes. In rats, it was demonstrated that estradiol specifically stimulates LH β gene transcription, by direct interaction of the estrogen-receptor (ER) complex with an estrogen regulatory element (ERE) on the LH β gene (Shupnik and Rosenzweig, 1991). The existence of ERE sequences on the LH β gene has been demonstrated in a salmonid fish species, suggesting similar mechanisms of steroid action in fish (Xiong *et al.*, 1994).

A recent study indicates the possible existence of several EREs on the FSH β gene of the tilapia, *Oreochromis niloticus* (Melamed *et al.*, 1998).

Negative steroid feedback on gonadotropin release, mainly for LH, has been established in fish. Several studies have shown that gonadectomy leads to increased FSH and/or LH plasma levels, while further treatment with estradiol or testosterone restores basal pre-gonadectomy plasma levels, indicating an inhibitory action of steroids on FSH and LH release (Bommelaer *et al.*, 1981; Kobayashi and Stacey, 1990; Larsen and Swanson, 1997; Saligaut *et al.*, 1998; Antonopoulou *et al.*, 1999). Steroids inhibit gonadotropin mRNA transcription in mammals (Gharib *et al.*, 1986). This inhibitory effect is relatively slow, requiring hours rather than the 20–30 min needed for the steroid to bind to its nuclear receptor and to initiate direct transcriptional effects (Maurer, 1982), suggesting that steroid action is not exerted directly on the gonadotrophic cells. This is supported by the failure of investigators to demonstrate steroid inhibition of gonadotropin subunit mRNA expression or gene transcription *in vitro*, in cultured pituitary cells. Saligaut and co-workers have demonstrated, in rainbow trout, that estrogens inhibit FSH and LH release and that, at least LH release, is under the influence of an estradiol-activated dopamine inhibitory tone (Linard *et al.*, 1995; Saligaut *et al.*, 1998). The most likely site of negative steroid feedback is thus the hypothalamus, directly to the GnRH neurons or by acting on other neuronal systems known to affect the GnRH system.

The Mediterranean Sea bass is a perciphorm fish, highly appreciated in the European market and with increasing importance in the development of the Mediterranean aquaculture. Under optimal conditions, the sea bass reproduce spontaneously in captivity. The females attain sexual maturity at approximately 3 years of age and then, reproduction is repeated once a year at the winter time; they present a group-synchronous type of ovarian development and may show up to four consecutive spawns during the 1–2 months spawning period. The males attain sexual maturity approximately 1 year earlier than females and then, they present a long spermiating period overlapping the winter reproductive cycle of the females (Carrillo *et al.*, 1995; Asturiano *et al.*, 2000). In culture conditions, a good number of premature males (puberty

at 1 year of age) and most important, a high proportion of males in sea bass farmed populations (up to 90% of the total population) are observed. Several investigations have established that sexual differentiation, puberty and the development of each reproductive cycle are processes highly determined by the internal steroid environment of the fish, through gonadotropin independent/dependent processes (Zanuy *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2000). Investigation of gonadotropin function in fish will increase our knowledge on the hormonal regulation of these processes and may lead to technologies for the control of reproduction of captive fish.

The recent cloning of the three gonadotropin subunits of sea bass (Mateos *et al.*, 1999a) and the development of specific molecular tools, allow for the first time to investigate, at the molecular level, the regulation of gonadotropin secretion in sea bass. The aim of the present study was to investigate the potential effects of GnRH and sexual steroids on pituitary α , FSH β and LH β mRNA levels. This information, together with the effects of GnRH and steroids on LH pituitary accumulation and release, should provide valuable information on the regulation of gonadotropin secretion in perciphorm fish, mainly regarding that of the FSH.

Material and methods

Fish

Experimental fish were bred and grown at the Instituto de Acuicultura de Torre la Sal (east coast of Spain, 40°N 0°E), under natural conditions of photoperiod and temperature. Fish were fed a commercial diet (EWOS Technology Center, UK) at a ratio of 1.5% in summer, 1% in spring– autumn and 0.5% in winter. In our latitudes, the reproductive cycle of sea bass in natural conditions takes place from October, with the initiation of gonadal growth, to April, followed by a resting period. Females spawn in February–March and males are normally spermiating from December to April. The present experiment was performed in August (water temperature approx. 25 °C), during the period of sexual resting, using 3-year-old fish (BW=500±40 g) of mixed sexes. The

sex of the fish was unknown before experimentation, as these fish did not go yet through their first reproductive cycle and no external signs of sexual dimorphism are present in this species. Nevertheless, sex was determined after killing by histological analysis of the gonad, and gave a sex ratio of approximately 1:1 in all groups. Before experimentation, fish were individually tagged and distributed in 3-m³ circular tanks with well-aerated flow-through seawater.

Treatments

Fish were divided in four experimental groups (n=16), placed on separate tanks, and received intra-peritoneal silastic implants (5x15 mm) containing estradiol (E₂ group), testosterone (T group) and dihydrotestosterone (DHT group) at a dose of 20 mg/kg BW (see Linard *et al.*, 1995, for implants). Controls received an implant with no steroid. After 12 days, each group was divided in two equal populations (n=8), and injected intraperitoneally with saline (controls) or GnRH_a (15 µg/kg BW of [D-Ala⁶, Pro⁹ Net]-mGnRH). Eighteen hours after injection, fish were decapitated and pituitaries removed and immediately frozen in liquid nitrogen, then stored at -80 °C until analysis. Blood samples were taken on anesthetized fish (0.2% phenoxyethanol, Sigma, St. Louis, USA) from the caudal vasculature, using heparinized syringes, just before implantation (day 0), before injection (day 12) and at 3 and 18 h after injection. Plasma was obtained by centrifugation (3000xg for 25 min, 4 °C) and stored at -20 °C until analysis. Steroids were purchased from Steraloids (USA) and the GnRH_a from Sigma. Animals were treated according to the Animal Care regulations of the European Union concerning the use of experimental animals.

Steroid analysis

Plasma E₂ levels were determined by RIA, previously validated for sea bass samples (Prat *et al.*, 1990). The sensitivity of the assay was approximately 0.5 ng/ml and the inter-



assay coefficient of variation (CV) approximately 18%. Plasma T levels were determined by an EIA validated for sea bass samples (Rodríguez *et al.*, 2001). The sensitivity of the assay was approximately 0.02 ng/ml and the inter-assay CV approximately 20%.

LH analysis

Levels of LH in plasma and pituitary were determined by homologous ELISA (Mateos *et al.*, 1999b), based on the method described for striped bass, *Morone saxatilis*, LH (Mañanós *et al.*, 1997a). The sea bass LH ELISA use specific polyclonal antibodies against the sea bass LH β subunit and sea bass LH for the standard curve. Plasma samples were diluted at least 10 times for analysis. Pituitary content of LH was determined from the protein extract obtained during the process of RNA isolation, according to the manufacturer's protocol, and diluted according to the concentration of the sample. The sensitivity of the assay was approximately 0.6 ng/ml and the interassay coefficient of variation approximately 13%.

Determination of pituitary gonadotropin RNA levels

Total RNA was prepared from individual pituitaries using the TRIzol reagent (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA), according to the manufacturer's protocol. The RNA pellets were resuspended in 0.05 ml DEPC-treated sterile water and stored at -80°C until analysis. Concentration and purity of the RNA was determined by OD absorbance at 260 and 280 nm.

Sea bass α , FSH β and LH β cDNAs (Mateos *et al.*, 1999a), together with a 110 base pair fragment of the sea bass 28s ribosomal RNA subunit obtained in our laboratory, were radiolabeled with [α - ^{32}P]dCTP (3000 Ci/mM; Amersham), using 32 the Random Prime DNA Labeling System kit (GibcoBRL). Before loading onto nylon membranes (Hybond N $^+$, Amersham), using the Bio-Dot apparatus from BioRad, individual total RNA samples and cDNA standards were treated for 15 min (65°C) with 50% formamide, 6% formaldehyde. Preliminary trials determined the range of the standard curve (from 0.4 to

50 pg cDNA/well) and the appropriate dilution of the samples (2, 4, 2 and 0.2 µg of loaded cDNA for hybridization with α , FSH β , LH β and 28s probes, respectively). Membranes were baked for 2 h (80 °C), prehybridized (6 h) and hybridized (overnight) at 42 °C, gently shaking, in 50% formamide, 0.5% SDS, 10% dextran sulfate, 5x SSPE and 5x Denhardt's solution. Membranes were then subjected to the following washes: 2x5 min in 1x SSC, 0.1% SDS at room temperature, 30 min in 1x SSC, 0.1% SDS at 65 °C, 3x30 min in 0.1xSSC, 0.1% SDS at 65 °C and 5 min in 1x SSC, 0.1% SDS at room temperature. The membranes were exposed to X-ray films (Hyperfilm-MP, Amersham) at -80 °C and the radioactive signals analyzed by densitometry (densitometer GS-670, BioRad) and quantified using a Molecular Analyst image analysis software (BioRad).

2.6. Statistics

All data are expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Differences between means were tested by multifactor analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey Honestly Significant Differences (HSD) test. Previously, the Kolmogorov-Smirnov test and Bartlett's test verified normality and homogeneity of variances, respectively. In all cases, significance was accepted at $P < 0.05$.

Results

Stage of the animals and plasma levels of steroids

Sea bass in the resting period were implanted intraperitoneally with silastic implants, containing 20 mg/kg BW of the corresponding steroid, estradiol (E₂ group), testosterone (T group) or the non-aromatizable androgen dihydrotestosterone (DHT group), whereas controls received an implant with no steroid (sham group). Twelve days after implantation, plasma samples from all fish were analyzed for E₂ and T levels (Fig. 1). Plasma E₂ levels were only increased in E₂-implanted fish (10.6 \pm 1.5 ng/ml), as compared to the other experimental groups (approx. 5 ng/ml). Similarly, plasma T levels increased

in T-implanted fish (14.6 ± 2.2 ng/ml) as compared to E₂- and sham-implanted fish (approx. 2 ng/ml); a slight non-significant elevation on plasma T levels was detected in the DHT-implanted group (3.9 ± 0.3 ng/ml). Steroid analysis confirmed the physiological plasma elevations of the expected steroid following implantation.

Regulation of LH pituitary content and release

Twelve days after implantation, fish from each group were half-spliced and injected with GnRHa (15 µg/kg BW) or saline (controls). Plasma samples were analyzed for LH levels at 3 h after injection, whereas pituitary content of LH was analyzed at 18 h after injection (Fig. 2). The effects of 12 days steroid implantation, can be observed in the saline-injected group of fish (black bars of the graphs). None of the steroids affected plasma LH levels, but they all increased similarly pituitary LH content, as compared with the control group. The GnRHa injection, highly elevated plasma LH levels 3 h p.i., as compared with saline injected fish, and this effect was similar in sham or steroid-implanted fish (Fig. 2, top). As expected, we observed a depletion of pituitary LH content 18 h p.i. (Fig. 2, bottom), also similar between implanted groups.

Effect of steroid implantation on gonadotropin gene expression

The levels of pituitary mRNAs for the three gonadotropin subunits, in sham- and steroid implanted fish, are shown in Fig. 3. All three subunit mRNAs were determined in aliquots of the same sample. Although the amount of loaded RNA in the dot-blot was previously adjusted to be homogenous for all wells, parallel aliquots were used for hybridization with the 28s cDNA probe. Analysis of 28s hybridized dots showed that all wells contained closely similar amounts of loaded RNA (data not shown). In any case, all values of subunit hybridizations were referred to the corresponding hybridization signal for 28s. Transcript levels of the α subunit were slightly stimulated (1.5-fold; non-significant $P < 0.05$) by E₂ and T, but not by DHT implantation, as compared to sham-implanted fish. Levels of LHβ mRNA were also slightly increased by E₂ (1.5-fold; non-

significant $P < 0.05$) and T (twofold; significant $P < 0.05$), as well as by DHT (1.5-fold; non-significant $P < 0.05$) implantation. However, transcript levels of FSH β were strongly inhibited by steroid implantation (significant $P < 0.05$), mainly by E₂ (15-fold inhibition) but also by T (sevenfold) and DHT (fourfold) implantation.

Effect of GnRHa injection on gonadotropin gene expression

The effect of GnRHa injection on transcript levels of the three gonadotropin subunits, in sham and steroid-implanted fish, is shown in Fig. 4. Looking at the effects on sham-implanted fish, injection of GnRHa induced a twofold increase (significant $P < 0.05$) on both α and LH β , while having no effect on FSH β mRNA levels. A similar increase (significant $P < 0.05$) on α and LH β RNA levels was observed in T-implanted fish. The GnRHa also stimulated slightly (approx. 1.5-fold; non-significant $P < 0.05$) α and LH β mRNA levels in E₂- and DHT-implanted fish, as compared to sham-implanted fish, but this effect was of lower magnitude than in T-implanted fish. The GnRHa injection had no effect on FSH β mRNA levels in any steroid implanted group.

Discussion

The regulation of gonadotropin secretion is a complex process, involving neuronal inputs from the brain, mainly the GnRH system, and steroid feedback mechanisms. In teleost fish, very little is known about a possible differential regulation of FSH and LH secretion during the reproductive cycle. In this study we aimed at investigating the potential role of GnRH and sexual steroids on gonadotropin secretion, in an economically important fish species, the Mediterranean sea bass. After the molecular cloning of the three gonadotropin subunits of sea bass (Mateos *et al.*, 1999a), this is the first report on pituitary gonadotropin subunit mRNA levels in this species. We show that steroid implantation have differential effects on gonadotropin transcript levels, stimulating LH while inhibiting FSH, by mainly acting on the mRNA levels of the corresponding β

subunits. Knowing the high aromatase activity in fish and in an attempt to investigate differential actions of estrogens (E_2 implantation) and androgens (T implantation), we also used the non-aromatizable androgen DHT, which may give us indications on the T effects that are not due to its aromatization to E_2 . Two other indications came out from this study, the similar actions of estrogens and androgens on the levels of the three gonadotropin transcripts and the stimulatory effect of GnRH α on LH, but not on FSH, synthesis.

For this investigation, we used sea bass in the resting period, when there is no gonadal growth and basal levels of circulating steroids and LH. The sex of the fish was unknown before experimentation, as there are no external signs of sexual dimorphism in sea bass and this fish population did not go yet through their first reproductive cycle. Nevertheless, histological analysis of the gonads after sacrifice allowed us to sex each individual and followed back their data for the corresponding analysis. Groups were studied as they were, without separation of fish by sexes, as the sex ratio for all groups was approximately 1:1 and we did not find any significant difference in the responses between sexes. Basal levels of plasma steroids, as well as LH, were similar between all fish, with no difference between sexes, as well as their response to steroid implantation.

Implantation of fish with E_2 or T for 12 days, resulted in an elevation of plasma levels, of the corresponding steroid, to values similar to highest physiological levels, mimicking the stage of final gonadal maturation in sea bass. At this period, we have found in previous works that, in control populations of sea bass reared in captivity, plasma levels of E_2 and T are approximately 7–14ng y ml, depending on the populations (Prat *et al.*, 1990; Carrillo *et al.*, 1995; Mañanós *et al.*, 1997b), which is in the range of the circulating levels attained in the present experiment, after 12 days of implantation. All steroids (E_2 , T, DHT) produced an increment in the pituitary content of LH, indicating a positive feedback on LH synthesis at this stage, as previously described in other fish species (Dufour *et al.*, 1983; Saligaut *et al.*, 1992; Breton and Sambroni, 1996; Breton *et al.*, 1997; Holland *et al.*, 1998; Saligaut *et al.*, 1998; Dickey and Swanson, 1998; Antonopoulou *et al.*, 1999). In contrast, steroids did not modify plasma LH levels,

suggesting that LH synthesis and release are two differently regulated processes. Similar observations were made in juvenile striped bass, in which T treatment elevated LH pituitary content but did not affect LH release (Holland *et al.*, 1998). In our study, we implanted the fish for 12 days (20 mg/kg BW of steroid) and we cannot discard the possibility that longer term treatments or higher doses of steroids could further induce release of LH, as previously demonstrated in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Breton and Sambroni, 1996; Breton *et al.*, 1997). The fact that the non-aromatizable androgen DHT highly increased pituitary LH content, suggest that LH synthesis is under both androgen and estrogen positive actions. Thus, T effects could be the result of its action as androgen and also by partial aromatization to E₂. Future experiments, using a range of lower and higher doses of steroids, will probably add more information and help to clarify androgenic and/or estrogenic positive effects over LH synthesis.

The injection of GnRHa in sham-implanted fish induced a strong elevation of plasma LH levels, indicating that sea bass at the resting period are sensitive to the GnRHa stimulus. The GnRHa induced LH release is not influenced by previous steroid priming, known to have augmented the LH stores of the pituitary. This might indicate that the GnRHa injection has induced maximal releasing capacity of the pituitary and, even if the LH stores were highly augmented by previous steroid treatment, no increase on LH release could be attained. In the present study, as we only performed blood samplings at 3 and 18 h post-injection, we cannot discard the possibility that differences on plasma LH levels have occurred, between different steroid implanted groups, at other times post-injection. This second possibility would be supported by the fact that the reduction of pituitary LH stores, observed at 18 h after GnRHa injection, was higher in steroid-implanted than in sham-implanted fish, which was particularly evident in the T-implanted fish. A facilitatory action of T on GnRH-stimulated LH release has been demonstrated in other fish species (Trudeau *et al.*, 1993). This possibility will be investigated in the future but, in the present study, mainly devoted to observe differences on pituitary mRNA levels, we did not want to stress the fish with multiple samplings between the GnRHa injection and the 18 h p.i. sacrifice. It can also be considered that injection with other

doses of GnRHa could produce different responses between the different steroid-implanted groups. In previous works on sea bass, testing the LH releasing potency of different doses of GnRHa, we have observed an increase of LH release with GnRHa doses from 1 to 15 mg/kg, but no further increment was detected with doses up to 50 mg/kg, indicating a saturation of the pituitary response (unpublished results).

This is the first report on pituitary gonadotropin mRNA levels in sea bass and we show that all three GTH mRNAs are transcribed during the period of sexual resting. At this time, the highest expression is that of the α subunit, while FSH β and LH β mRNAs are similarly expressed. At present is not known what are the expression levels of the gonadotropin subunits at other reproductive stages of the sea bass. In the closely related species striped bass, both LH β and FSH β are expressed in the pituitary of juvenile (Hassin *et al.*, 1995) and early-spermatogenic adult (Hassin *et al.*, 1998) fish, being LH β expression higher than that of FSH β . Both transcripts are also expressed throughout the reproductive cycle of the gilthead sea bream, *Sparus aurata* (Elizur *et al.*, 1996). In contrast, expression of FSH β is much higher than that of LH β in pre-gametogenic salmonid fish (Weil *et al.*, 1995; Gómez *et al.*, 1999), correlating to the fluctuations of plasma FSH and LH levels. Unfortunately, we have no data on plasma FSH levels in non-salmonid fishes, but the different patterns of gonadotropin gene expression indicate, as previously suggested (Elizur *et al.*, 1996), differences in FSH and LH secretion patterns between perciphorms and salmonids.

A positive steroid feedback was evident on LH synthesis. The levels of LH β mRNA were increased by T implantation (2.4-fold), but not by E₂ or DHT, while those of the α subunit were not significantly modified by any steroid treatment. The possibility that estrogens and androgens can have a positive effect on LH synthesis may not be ruled out, as both E₂ and the non-aromatizable androgen DHT caused a slight non-significant elevation (1.7-fold) of LH β transcripts. To further investigate this hypothesis, future studies using several doses of steroids, mainly a range of lower doses, will probably help to discriminate the differential stimulatory actions of androgens and estrogens over LH β and α mRNA synthesis in sea bass. A stronger stimulatory effect of T than E₂, on LH

pituitary content, has been reported in other fishes, such as the rainbow trout (Breton *et al.*, 1997). Works on the Atlantic salmon, *Salmo salar*, have demonstrated a double androgenic/estrogenic action of T in stimulating LH synthesis, in which T treatment alone increase LH pituitary content to a greater extent than a combined treatment of T and the aromatase inhibitor ATD (Antonopoulou *et al.*, 1999). Stimulatory actions of E₂ and/or T on LH β mRNA levels have been described in immature trout (Trinh *et al.*, 1986), European eel (*Anguilla anguilla*: Qu  rat *et al.*, 1991), chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*: Xiong *et al.*, 1994), coho salmon (Dickey and Swanson, 1998), goldfish (*Carassius auratus*: Huggard *et al.*, 1996) and cultured pituitary cells from eel (Huang *et al.*, 1997). In these studies, and ours, differences arise in the degree of steroid stimulation and in the relative actions of E₂ and T, which may reflect inter-specific differences and/or variations due to different physiological stages of the fish. Studies in salmonids showed that the stimulatory effects of T and E₂ on LH β mRNA varied throughout the year, being significant in immature, slight in mature and absent in spawning fish (Xiong *et al.*, 1994). These authors reported a direct steroid action on the pituitary, on the EREs of the LH β gene, and described different activities of the LH β promoter depending on the maturational stage of the fish.

From the present study, we cannot say if the stimulatory effect of steroids on α and LH β transcripts is at the level of the pituitary, the hypothalamus or both. Estrogens are known to act directly on the gonadotroph cell by activating EREs on the LH β gene promoter and thus stimulating its transcription (Le Dr  an *et al.*, 1996). On the gonadotroph cell, steroids can also stimulate the transcription of other genes known to influence gonadotroph sensitivity to stimulatory factors, such as the GnRH receptors (Habibi *et al.*, 1989). However, steroids can act at the brain level, by direct or indirect stimulation of the GnRH system (Montero *et al.*, 1996) or other neurons known to have gonadotropic activity, such as dopamine, NPY or GABA (Kah *et al.*, 1997). For the moment, no information on this regard is available on sea bass although, as in other fish species, a combination of several mechanisms of action would probably be the key for the complex steroid feedback regulation of the gonadotropic function.

In contrast to the stimulatory action on α and LH β transcripts, all steroids inhibited the mRNA levels of the FSH β subunit. The E₂ showed the strongest inhibitory action on FSH β transcripts (10-fold from sham), although an androgenic inhibition is evident by the action of DHT (threefold from sham). These results agree with the few previous reports studying the regulation of FSH secretion in fish. In Atlantic salmon, T treatment exerts a negative feedback on pituitary and plasma FSH levels (Antonopoulou *et al.*, 1999). Negative feedback of steroids on FSH release has also been demonstrated in coho salmon, *Salmo salar* (Larsen and Swanson, 1997; Dickey and Swanson, 1998) and rainbow trout (Saligaut *et al.*, 1998). These results have been further used to explain that, during the reproductive cycle of rainbow trout, raising E₂ plasma levels are coincident with the decline of plasma FSH levels; similarly, pituitary FSH mRNA levels also declined at periods corresponding to high plasma steroid levels (Gómez *et al.*, 1999). An inhibitory action of estrogens on FSH β mRNA levels has been reported in recrudescing goldfish (Sohn *et al.*, 1998) and adult coho salmon (Dickey and Swanson, 1998). In coho salmon, E₂ treatment had no effect on plasma FSH or FSH β mRNA levels in immature fish (Dickey and Swanson, 1995) and early recrudescing females (Swanson and Dickey, 1996), but inhibits FSH β mRNA levels in early recrudescing males and reduced plasma FSH in vitellogenic females (Swanson and Dickey, 1996). Nevertheless, positive feedback effects of steroids on pituitary and/or plasma FSH levels have been described in rainbow trout (Breton *et al.*, 1997) and Atlantic salmon (Borg *et al.*, 1998). Thus, it appears that steroids exert a predominant negative feedback on FSH secretion in fish, although their effects are complex and may vary between species and different physiological stages, as has been previously suggested in salmonid fish (Antonopoulou *et al.*, 1999). Also, different results between studies might arise from different experimental conditions, such as the tested doses of steroids and the mode of administration.

The GnRH α injection stimulated α and LH β transcripts, but had no effects on FSH β mRNA levels (sham-implanted fish). These effects were independent of steroidal priming, although it is worthy to note that it was the T-implanted fish who attained the highest levels of mRNAs for both α and LH β , after GnRH α injection. The stimulatory

effects of GnRHa on LH β , further strength the indication that the sea bass pituitary is sensitive to the GnRH stimulus at periods of reproductive resting. Similarly to our data, studies performed on the striped bass have described a differential regulation of LH and FSH transcription by GnRHa. Injection of juvenile striped bass with GnRHa (20 mg/kg) highly stimulated α and LH β expression, but only slightly that of FSH β , 9 h after injection (Hassin *et al.*, 1995). Using early spermatogenic adult striped bass, these authors observed a high increase of α and LH β transcripts after 6 h of GnRHa injection (100 mg/kg), while FSH β transcripts increased slightly only after 24 h of injection (Hassin *et al.*, 1998). In our study, although we did not see any effect of GnRHa over FSH β mRNA at 18 h p.i., we cannot discard possible effects at shorter or longer times p.i. or even at different reproductive stages. The action of GnRH on gonadotropin gene expression has been studied in other fishes, although the results are different depending on the species and the physiological stage of the fish. In the gilthead sea bream, treatment of adult fish with different GnRHs did not modify FSH β or LH β gene expression at 8 and 24h p.i. (Elizur *et al.*, 1995). In recrudescing male coho salmon, GnRHa injection elevated FSH β but not LH β transcripts (Swanson and Dickey, 1996). In sexually mature goldfish, exogenous GnRHa stimulated α and LH β mRNA levels (Khakoo *et al.*, 1994), as observed in the present work. Stimulatory effects of GnRH on LH β mRNA have also been reported in vitro, in cultured pituitary cells of tilapia (Melamed *et al.*, 1998). It seems clear, from our and previous studies, that FSH and LH transcription is differently regulated by GnRHa, but these effects are variable depending on the species and the reproductive stage of the fish. Differences in the stimulatory action of GnRH on both FSH and LH release, depending on the reproductive stage of the fish, have been demonstrated in the rainbow trout (Breton *et al.*, 1998). As suggested in mammals, the density of GnRH receptors and/or activation of different signal transduction pathways, may account for differential regulation of FSH and LH gene expression by GnRH in the gonadotrophic cells (Kaiser *et al.*, 1995).

In conclusion, high circulating steroid levels, similar to those observed at stages of final gonadal maturation of the sea bass (annual peak), exert a positive feedback action on

LH, by increasing pituitary LH content and pituitary LH β mRNA levels. However, a strong negative feedback on FSH β mRNA is evident in this situation. The GnRH α stimulates LH release (plasma levels) and pituitary LH β mRNA levels, but have no effect on FSH β mRNA levels. It is clear that, at these levels, all steroids have similar actions on both FSH and LH synthesis and release and that the effects of GnRH α are not highly influenced by previous steroidal priming. Our data suggest that, physiologically, raising levels of circulating steroids would act on the pituitary facilitating LH synthesis and release, over that of the FSH. Although no information is still available on the secretion of FSH in non-salmonid species, such as the sea bass and other perciphorms, our data would strength previous biological evidences that relates fish GTH-1 and GTH-2 with tetrapod FSH and LH, respectively.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr Thierry Baillache, from the University of Rennes (France), for his valuable help in the preparation of the silastic implants and his advice on the implantation methodology. Thanks are extended to Dr Olivier Kah (University of Rennes, France), for his support and scientific discussions. J. Mateos received a fellowship from the Spanish Ministry of Education and Science. E. Mañanós was a recipient of a European Marie-Curie post-doctoral grant (FAIR GT95-6462). This work was financially supported by the European Community (FAIR CT97-3785) and the CICYT (MARI1998-1542-CE).

References

- Antonopoulou, E., Swanson, P., Mayer, I., Borg, B., 1999. Feedback control of gonadotropins in Atlantic salmon, *Salmo salar*, male parr. II. Aromatase inhibitor and androgen effects. *Gen. Comp. Endocrinol.* 114, 142–150.

- Asturiano, J.F., Sorbera, L.A., Ramos, J., Kime, D.E., Carrillo, M., Zanuy, S., 2000. Hormonal regulation of the European sea bass reproductive cycle: and individualized female approach. *J. Fish Biol.* 56, 1155–1172.
- Beato, M., Herrlich, P., Schulz, G., 1995. Steroid hormone " receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83, 851–857.
- 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.). *Reprod. Nutr. Develop.* 21, 989–997.
- Bon, E., Breton, B., Govoroun, M.S., Le Menn, F., 1999. Effects of accelerated photoperiod regimes on the reproductive cycle of the female rainbow trout: II Seasonal variations of plasma gonadotropins (GTH I and GTH II) levels correlated with ovarian follicle growth and egg size. *Fish Physiol. Biochem.* 20, 143–154.
- Borg, B., Antonopoulou, E., Mayer, I., Andersson, E., Berglund, I., Swanson, P., 1998. Effects of gonadectomy and androgen treatments on pituitary and plasma levels of gonadotropins in Atlantic salmon, *Salmo salar*, mature male parr — Physiological positive feedback control of both gonadotropins. *Biol. Reprod.* 58, 814–820.
- Breton, B., Sambroni, E., 1996. Steroid activation of the brain–pituitary complex gonadotropic function in the triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 101, 155–164.
- Breton, B., Mikolajczyk, T., Popek, W., 1993. The neuroendocrine control of the gonadotropin (GtH2) secretion in teleost fish. In: Lalhau, B., Vitello, P. (Eds.), *Aquaculture: Fundamental and Applied Research*. American Geophysical Union, pp. 199–215.
- Breton, B., Sambroni, E., Govoroun, M., Weil, C., 1997. Effects of steroids on GTH I and GTH II secretion and pituitary concentration in the immature rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *C R Acad. Sci. Paris Life Sci.* 320, 783–789.

- 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 GnRHa stimulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 111, 38–50.
- Burzawa-Gerard, E., 1982. Chemical data on the pituitary gonadotropins and their implication to evolution. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39, 80–91.
- Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., *et al.*, 1995. Sea bass. In: Bromage, N.R., Roberts, J. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, London, pp. 138–168.
- Counis, R., Dufour, S., Ribot, G., Quérat, B., Fontaine, Y.-A., Jutisz, M., 1987. Estradiol has inverse effects on pituitary glycoprotein α -subunit messenger ribonucleic acid in the immature European eel and the gonadectomized rat. *Endocrinology* 121, 1178–1184.
- Crim, L.W., Evans, D.M., 1979. Stimulation of pituitary gonadotropin by testosterone in juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 37, 192–196.
- Crim, L.W., Evans, D.M., 1980. LH-RH-stimulated gonadotropin release from the rainbow trout pituitary gland: an in vivo assay for detection of gonadotropin releasing factor(s). *Gen. Comp. Endocrinol.* 40, 283–290.
- Dickey, J.T., Swanson, P., 1995. Development of RNase protection assays for quantification of gonadotropin (GTH I and GTH II) subunit transcript levels in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). In: Goetz, F.W., Thomas, P. (Eds.), *Reproductive Physiology of Fish, Fish Symposium 95, Austin, Texas*. pp. 28
- Dickey, J.T., Swanson, P., 1998. Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kitsutch*). *J. Mol. Endocrinol.* 21, 291–306.
- Dickey, J.T., Swanson, P., 2000. Effects of salmon gonadotropin-releasing hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 118, 436–449.
- Dufour, S., Delerue-Le Belle, N., Fontaine, Y.-A., 1983. Effects of steroid hormones on pituitary immunoreactive gonadotropin in European freshwater eel, *Anguilla anguilla* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 52, 190–197.

- Elizur, A., Meiri, I., Rosenfeld, H., Zmora, N., Knibb, W.R., Zohar, Y., 1995. Seabream gonadotropins: sexual dimorphism in gene expression. In: Goetz, F.W., Thomas, P. (Eds.), Reproductive Physiology of Fish, Fish Symposium 95, Austin, Texas. pp. 13–15.
- Elizur, A., Zmora, N., Rosenfeld, H., Meiri, I., Hassin, S., Gordin, H., Zohar, Y., 1996. Gonadotropins beta-GtHI and beta-GtHII from the gilthead seabream, *Sparus aurata*. Gen. Comp. Endocrinol. 102, 39–46.
- Gharib, S.D., Bowers, S.M., Need, L.R., Chin, W.W., 1986. Regulation of rat luteinizing hormone subunit mRNAs by gonadal steroid hormones. J. Clin. Invest. 77, 582–589.
- 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, 413–428.
- Habibi, H.R., De Leeuw, R., Nahorniak, C.S., Goos, H.J.T.h, Peter, R.E., 1989. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor activity in goldfish and catfish: seasonal and gonadal effects. Fish Physiol. Biochem. 7, 109–118.
- Hassin, S., Elizur, A., Zohar, Y., 1995. Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotrophin- I and -II subunits. J. Mol. Endocrinol. 15, 23–35.
- Hassin, S., Gothilf, Y., Blaise, O., Zohar, Y., 1998. Gonadotrophin- I and -II subunit gene expression of male striped bass (*Morone saxatilis*) after gonadotropin-releasing hormone analogue injection: quantitation using an optimized ribonuclease protection assay. Biol. Reprod. 58, 1233–1240.
- Holland, M.C.H., Hassin, S., Zohar, Y., 1998. Effects of longterm testosterone, gonadotropin-releasing hormone agonist, and pimoziide treatments on gonadotropin II levels and ovarian development in juvenile female striped bass (*Morone saxatilis*). Biol. Reprod. 59, 1153–1162.

- Huang, Y.S., Schmitz, M., Le Belle, N., Chang, C.F., Quérat, B., Dufour, S., 1997. Androgens stimulate gonadotropin-II β subunit in eel pituitary cells in vitro. *Mol. Cell. Endocrinol.* 131, 157–166.
- Huggard, D., Khakoo, Z., Kassam, G., Mahmoud, S.S., Habibi, H.R., 1996. Effect of testosterone on maturational gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels in the goldfish pituitary. *Biol. Reprod.* 54, 1184–1191.
- Kah, O., Anglade, I., Linard, B., Pakdel, F., Salbert, G., Bailhache, T., Ducouret, B., Saligaut, C., LeGoff, P., Valotaire, Y., Jégo, P., 1997. Estrogen receptors in the brainpituitary complex and the neuroendocrine regulation of gonadotropin release in rainbow trout. *Fish Physiol. Biochem.* 17, 53–62.
- Kaiser, U.B., Sabbagh, E., Katzenellenbogen, R.A., Conn, P.M., Chin, W.W., 1995. A mechanism for the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 12280–12284.
- Kawauchi, H., Suzuki, K., Itoh, H., Swanson, P., Naito, N., Nagahama, Y., Nozaki, M., Nakai, Y., Itoh, S., 1989. The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 29–38.
- Khakoo, Z., Bhatia, A., Gedamu, L., Habibi, H.R., 1994. Functional specificity for salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II coupled to the gonadotropin release and subunit messenger ribonucleic acid level in the goldfish pituitary. *Endocrinology* 134, 838–847.
- Kobayashi, M., Stacey, E.N., 1990. Effects of ovariectomy and steroid hormone implantation on serum gonadotropin levels in female goldfish. *Zool. Sci.* 7, 715–721.
- Larsen, D.L., Swanson, P., 1997. Effects of gonadectomy on plasma gonadotropins I and II in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 152–160.
- Le Dréan, Y., Liu, D., Wong, A.O.L., Xiong, F., Hew, C.L., 1996. Steroidogenic factor 1 and estradiol receptor act in synergism to regulate the expression of the salmon gonadotropin II β subunit gene. *Mol. Endocrinol.* 10, 217–229.

- Linard, B., Bennani, S., Saligaut, C., 1995. Involvement of estradiol in a catecholamine inhibitory tone of gonadotropin release in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen. Comp. Endocrinol. 99, 192–196.
- Mañanós, E.L., Swanson, P., Stubblefield, J., Zohar, Y., 1997a. Purification of gonadotropin II from a teleost fish, the hybrid striped bass, and development of a specific enzymelinked immunosorbent assay. Gen. Comp. Endocrinol. 108, 209–222.
- Mañanós, E.L., Zanuy, S., Carrillo, M., 1997b. Photoperiodic manipulation of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development, and plasma 17 β -estradiol and vitellogenin levels. Fish Physiol. Biochem. 16, 211–222.
- Mañanós, E.L., Anglade, I., Chyb, J., Saligaut, C., Breton, B., Kah, O., 1999. Involvement of γ -aminobutyric acid in the control of GTH-1 and GTH-2 secretion in male and female rainbow trout. Neuroendocrinology 69, 269–280.
- Mateos, J., Martínez, G., Mañanós, E., Carrillo, M., Zanuy, S., 1999a. Clonación de las secuencias completas de las subunidades α , β FSH y β LH de las gonadotropinas de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). Proceedings of the Seventh National Conference of Aquaculture, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, P 167 (Abstract).
- Mateos, J., Mañanós, E., Govoroun, M., Breton, B., Carrillo, M., Zanuy, S., 1999b. Purificación de las gonadotropinas, FSH y LH de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) y diseño de un ELISA para la LH. Proceedings of the Seventh National Conference of Aquaculture, Las Palmas de Gran Canaria, Spain, P 166 (abstract).
- Maurer, K.E., 1982. Estrogen regulates the transcription of the prolactin gene. J. Biol. Chem. 257, 2133–2136.
- Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., Yaron, Z., 1998. Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. Comp. Biochem. Physiol. 119C, 325–338.
- Montero, M., Le Belle, N., King, J.A., Millar, R.P., Dufour, S., 1996. Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and

- cGnRH-II) by sex steroids in the European silver eel (*Anguilla anguilla*). *Endocrinology* 134, 838–847.
- Pierce, J.G., 1988. Gonadotropins: chemistry and biosynthesis. In: Knobil, E., Neill, J. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 1335–1348.
- Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M., de Mones, A., Fostier, A., 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78, 361–373.
- 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.
- Quérat, B., 1994. Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates. In: Davey, K.G., Peter, R.E., Tobe, S.S. (Eds.), *Perspectives in Comparative Endocrinology*. National Research Council of Canada, Ottawa, pp. 27–35.
- Quérat, B., Hardy, A., Fontaine, Y.A., 1991. Regulation of the type-II gonadotrophin α and β subunit mRNAs by oestradiol and testosterone in the European eel. *J. Mol. Endocrinol.* 7, 81–86.
- Rodríguez, L., Carrillo, M., Sorbera, L.A., Soubrier, M.A., Mañanós, E.L., Holland, M.C.H., Zohar, Y., Zanuy, S., 2000. Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120, 67–74.
- Rodríguez, L., Begtashi, I., Zanuy, S., Carrillo, M., 2001. Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at puberty. *Fish Physiol. Biochem.* 23, 141–150.
- Saligaut, C., Garnier, D.H., Bennani, S., Salbert, G., Bailhache, T., Jégo, P., 1992. Effects of estradiol on brain aminergic turnover of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at the beginning of the vitellogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88, 209–216.

- Saligaut, C., Linard, B., Mañanós, E.L., Kah, O., Breton, B., Govoroun, M., 1998. Release of pituitary gonadotrophins GtH I and GtH II in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): modulation by estradiol and catecholamines. *Gen. Comp. Endocrinol.* 109, 302–309.
- Shupnik, M.A., Rosenzweig, B.A., 1991. Identification of an estrogen-responsive element in the rat LH β gene. *J. Biol. Chem.* 266, 17084–17091.
- Slater, C.H., Schreck, C.B., Swanson, P., 1994. Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp. Biochem. Physiol.* 109A, 167–175.
- Sohn, Y.C., Yoshiura, Y., Kobayashi, M., Aida, K., 1998. Effect of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin I and II subunits in the goldfish *Carassius auratus*. *Fish. Sci.* 64, 715–721.
- Swanson, P., 1991. Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.M., Rolfe, M.S. (Eds.), *Reproductive Physiology of Fish*, Fish Symposium, University of East Anglia, Norwich, UK. pp. 2–7.
- Swanson, P., Dickey, J.T., 1996. Regulation of gonadotropin I by sex steroids and gonadotropin-releasing hormone in coho salmon. *Proceedings of the Third International Symposium on Fish Endocrinology*. Hakodate, Japan, pp. 65 (abstract).
- Trinh, K.-Y., Wang, N.C., Hew, C., Crim, L.W., 1986. Molecular cloning and sequencing of salmon gonadotropin β subunit. *Eur. J. Biochem.* 159, 619–624.
- Trudeau, V.L., 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev. Reprod.* 2, 55–68.
- Trudeau, V.L., Murthy, C.K., Habibi, H.R., Sloley, B.D., Peter, R.E., 1993. Effects of sex steroid treatments on gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin secretion from the goldfish pituitary. *Biol. Reprod.* 48, 300–307.
- Vacher, C., Mañanós, E.L., Marmignon, M.H., Saligaut, C., 2000. Modulation of pituitary dopamine D-1 or D-2 receptors and secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the annual reproductive cycle of female rainbow trout. *J. Neuroendocrinol.* 12, 1219–1226.

- Weil, C., Bougoussa-Houadec, M., Gallais, C., Itoh, S., Sekine, S., Valotaire, Y., 1995. Preliminary evidence suggesting variations of GtH 1 and GtH 2 mRNA levels at different stages of gonadal development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Gen. Comp. Endocrinol. 100, 327–333.
- Xiong, F., Liu, D., Le Dréan, Y., Elsholtz, H.P., Hew, C.L., 1994. Differential recruitment of steroid hormone response elements may dictate the expression of the pituitary gonadotropin II β subunit gene during salmon maturation. Mol. Endocrinol. 8, 782–793.
- Zanuy, S., Carrillo, M., Mateos, J., Trudeau, V., Kah, O., 1999. Effects of sustained administration of testosterone in prepubertal sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). Aquaculture 177, 21–35.

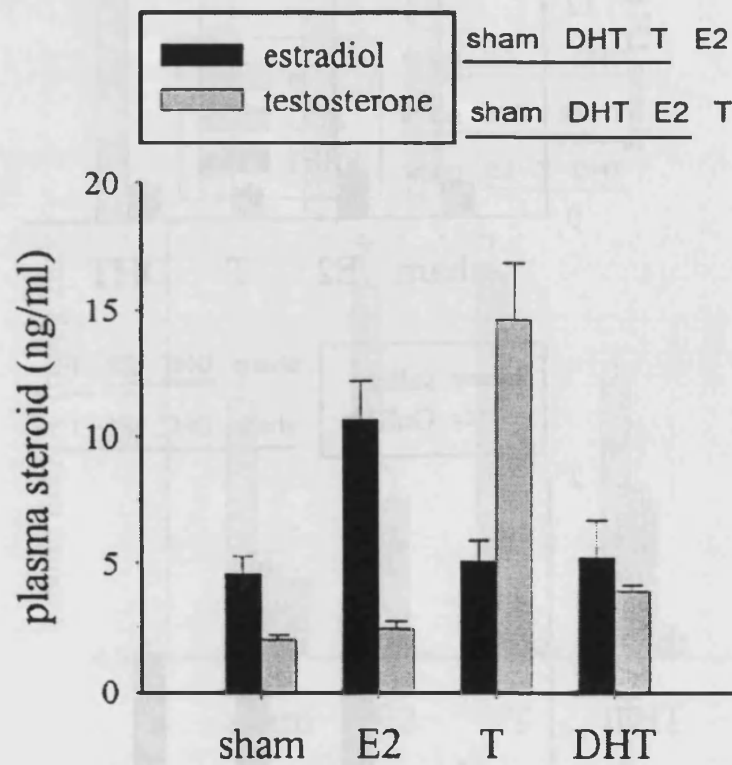


Fig. 1.

Plasma levels of estradiol (black bars) and testosterone (gray bars), in all experimental groups, after 12 days of implantation with 20 mg/kg BW of estradiol (E₂), testosterone (T) or dihydrotestosterone (DHT). Sham-implanted fish received an implant with no steroid. Data are mean±S.E.M. (n=8). Steroid levels sharing the same underscore, for a given analysis, are not statistically different (P<0.05).

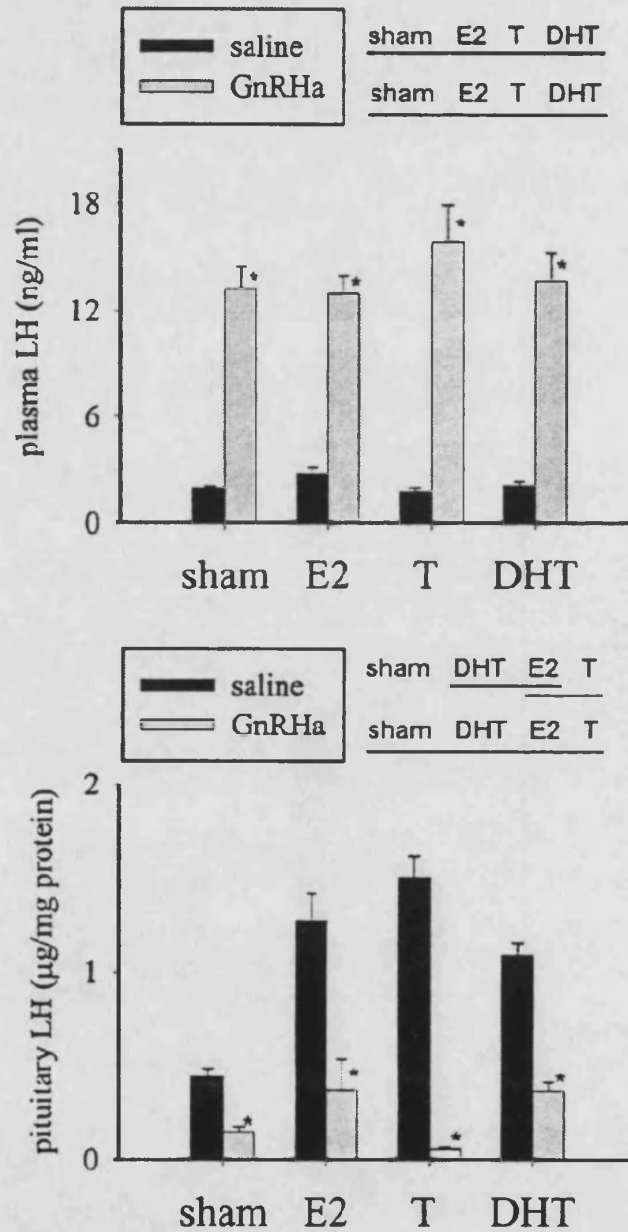


Fig. 2.

Plasma levels (top graph) and pituitary content (bottom graph) of LH, in sham-, E₂-, T- and DHT-implanted fish, after injection with saline (black bars) or with 15 mg/kg BW of GnRH_a (gray bars). Plasma levels were determined at 3 h p.i., whereas pituitary content was determined at 18 h p.i. Data are mean±S.E.M. (*n*=8). LH levels sharing the same underscore, for a given injection, are not statistically different (*P*<0.05); asterisks indicate, for a given implant, statistical differences between saline and GnRH_a injection (*P*<0.05).

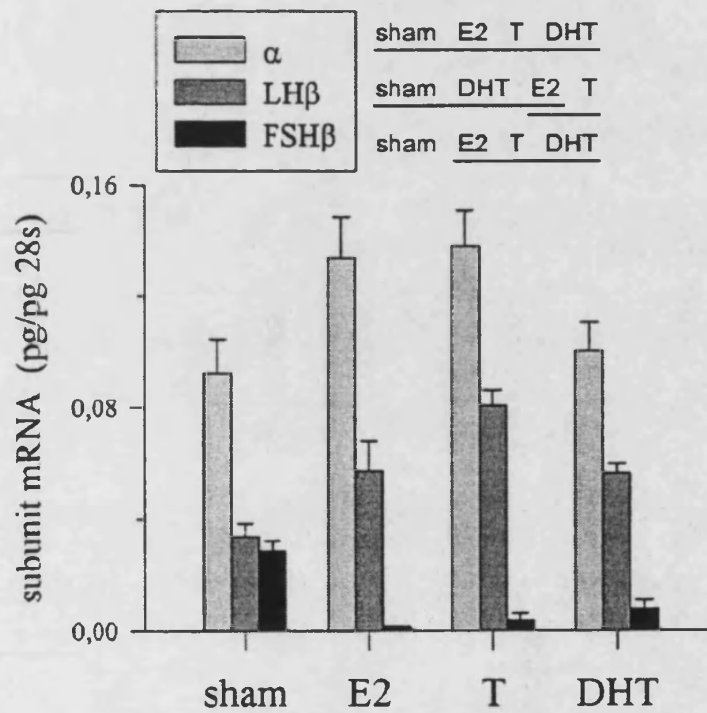


Fig. 3.

Pituitary mRNA levels for α , LH β and FSH β subunits, in sham-, E₂-, T- and DHT-implanted fish, after 12 days of implantation. Data are mean \pm S.E.M. ($n=8$) and are expressed as pg of the corresponding subunit related to pg of 28s mRNA, determined in the same sample. Subunit mRNA levels sharing the same underscore are not statistically different ($P<0.05$).



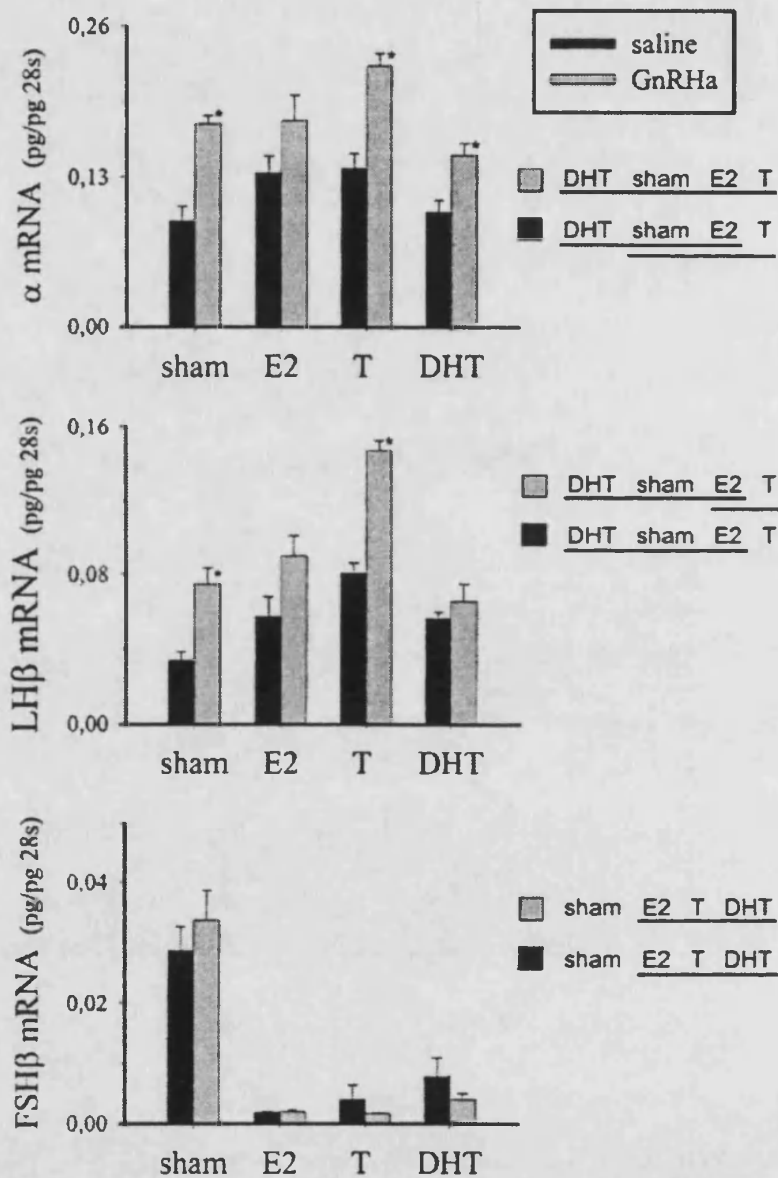


Fig. 4.

Pituitary mRNA levels for α , LH β and FSH β subunits in the four experimental groups, 18 h after injection with saline or 15 mg/kg BW of GnRH α . Fish were previously implanted for 12 days with estradiol (E $_2$), testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT) or non-steroid (sham). Data are mean \pm S.E.M. ($n=8$) and are expressed as pg of the corresponding subunit related to pg of 28s mRNA, determined in the same sample. Subunit mRNA levels sharing the same underscore, for a given injection, are not statistically different ($P < 0.05$); asterisks indicate, for a given implant, statistical differences between saline and GnRH α injection ($P < 0.05$).

**RESUMEN DE RESULTADOS
Y DISCUSIÓN**

Caracterización molecular de las gonadotropinas de la lubina

Artículo I: 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 reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 133: 216-232.

Clonación y análisis de las secuencias de las subunidades α , β LH y β FSH de la lubina

En este trabajo se incluye la clonación de los tres cDNA completos de las tres subunidades de las gonadotropinas (α , FSH β y LH β), a partir de una librería de genes de glándula pituitaria y encéfalo de lubina. La secuencia nucleotídica del cDNA de la subunidad α de las glicoproteínas tiene 625 pares de bases (pb) de longitud, codifica un péptido maduro de 94 aminoácidos (aa), la subunidad FSH β tiene 521 pb, codifica un péptido maduro de 105 aa y la LH β tiene 591 pb, para un péptido maduro de 115 aa.

La comparación de la secuencia de la subunidad α de las gonadotropinas de la lubina con las de otros vertebrados ha demostrado que las posiciones de los 10 residuos de cisteína están muy conservadas. Estas cisteínas dan lugar a la formación de 5 puentes disulfuro que pliegan a la subunidad α (Lapthorn, 1994). También está muy conservada la región de los aminoácidos 33 a 66 que incluye dos parejas de cisteínas adyacentes y de las 2 probables asparaginas glicosiladas. Varios autores han sugerido que esta región pueda estar implicada en los procesos de ensamblaje de las subunidades y de unión al receptor, tanto en tetrápodos (Xia *et al.*, 1994) como en teleósteos (Gen *et al.*, 2000).

El análisis de las secuencias de aminoácidos de las subunidades β FSH y β LH de la lubina indica que la posición de las 12 cisteínas está bien conservada. Al igual que en la subunidad α , las cisteínas dan lugar a la formación de puentes disulfuro, 6 en el caso de la subunidades β . Estos enlaces covalentes entre cisteínas doblan a la proteína y dan lugar a la conformación rígida de la familia proteica de las GTHs, mediante la formación de una especie de cinturón de seguridad. El brazo formado por el extremo carboxilo de las subunidades β se pliega con tres puentes disulfuros abrazando a la subunidad α , dando lugar a una unión fuerte entre las dos subunidades aunque no se forman enlaces covalentes entre ellas (Lapthorn, 1994). La posición de las asparaginas glicosiladas de las subunidades β también está conservada entre las secuencias conocidas de los vertebrados. A estas cadenas de polisacáridos se les implica el papel de la bioactividad de las GTHs, específicamente el estímulo de las funciones posteriores a la unión con el receptor, es

decir la activación de la proteína G y de los segundos mensajeros (Beitins y Padmanabhan, 1991). La glicosidación de las GTHs también desempeña un importante papel en los mecanismos de unión del receptor a la adenilato ciclasa (Arey *et al.*, 1997).

El análisis del DNA genómico de la lubina revela que el genoma de la lubina contiene una sola copia de los genes de las subunidades α , β FSH y β LH. La digestión del DNA genómico con enzimas de restricción y la hibridación con sondas de cDNA de α , β FSH y β LH, dio lugar a la formación de un solo fragmento de restricción para cada subunidad. El hecho de que cada una de las subunidades de las GTHs de la lubina estén codificadas por un sólo gen también se apoya en los resultados del análisis mediante Northern blot, que evidenciaron una única transcripción del mRNA de α , β FSH y β LH en la pituitaria. El tamaño de los transcriptos de las subunidades analizados por Northern blot es mayor que el calculado para las secuencias de cDNA clonadas, lo que se podría atribuir a la longitud de la cola de poliadenina (Gen *et al.*, 2000). En conjunto, estos resultados indican que la pituitaria de la lubina contiene y expresa copias únicas de los genes de las subunidades de α , β FSH y β LH. Esto está de acuerdo con otros trabajos en teleósteos (Gen *et al.*, 2000; Hassin *et al.*, 1995) y vertebrados superiores (Fiddes y Goodman, 1981), en los que se encontraron copias únicas de cada gen de las subunidades de las GTHs. Por otra parte, se ha publicado en varias especies de peces tetraploides, pertenecientes a los grupos de condóstreos, salmónidos y ciprínidos, que las subunidades de las GTHs se pueden codificar por dos genes (Gen *et al.*, 1993; Huang *et al.*, 1992; Quérat *et al.*, 2000; Sekine *et al.*, 1989; Yoshiura *et al.*, 1997).

Origen y evolución de las gonadotropinas

La alineación de la secuencia de la subunidad α con las de otros peces ha mostrado que hay una alta correlación entre los porcentajes de identidad y las relaciones filogenéticas. La similaridad más alta (100%) se dio con la lubina americana (*M. saxatilis*), una especie estrechamente relacionada. Las similaridades con otros órdenes de peces se extendieron del 84-96% para perciformes, del 79-80% para pleuronectiformes,

de alrededor del 70% para Cipriniformes y Ciprinodontiformes y de un 60% aproximadamente para otros teleósteos a un 49% con los elasmobranquios (Fig 1).

La comparación de las secuencias de aminoácidos de las subunidades β de las GTHs de la lubina con las de otros peces, ha demostrado que hay mayores semejanzas entre las secuencias de β LH que entre las de β FSH. Las secuencias de la β FSH y la β LH de la lubina americana (*M. saxatilis*) son las más similares a las secuencias respectivas de la lubina (98%). La identidad de las secuencias de la β FSH de la lubina, es de alrededor del 70% con los perciformes y los pleuronectiformes, del 40% con otros teleósteos y del 32% con los elasmobranquios. La identidad de la secuencia de la β LH es de alrededor del 90% con perciformes, del 80% con pleuronectiformes, del 60 al 70% con otros teleósteos y del 46% con elasmobranquios (Fig 1).

Los estudios filogenéticos de la evolución molecular de las secuencias de las GTHs de vertebrados indican que la subunidad α está más conservada, mientras que las subunidades β de las GTHs han divergido más rápidamente. Según han sugerido Quérat y sus colaboradores (Quérat, 1994; Quérat *et al.*, 2000), las subunidades β FSH han divergido más rápidamente durante la evolución de los teleósteos y son más específicas que las subunidades β LH.

La secuencia de la β FSH de la lubina es más similar a la β FSH que a la β LH de tetrápodos (el 35% con β FSH de *Rattus* contra el 26% con β LH de *Rattus*) y de la misma manera, la secuencia de la β LH de la lubina es más similar a las secuencias de la β LH (el 40% con la β LH de *Rattus* y el 26% con la β FSH de *Rattus*). En estudios filogenéticos anteriores se ha demostrado que las subunidades β de las GTHs de vertebrados se separan en dos linajes monofiléticos, uno que agrupa a las FSHs de peces y vertebrados y otro linaje para la LH de los peces junto con las de otros vertebrados (Quérat *et al.*, 2000). Estos estudios apoyan la homología entre la FSH de los peces y la FSH de los tetrápodos y la LH de los peces con la LH de los tetrápodos.

Síntesis de las gonadotropinas en la lubina macho

Para analizar los niveles de expresión del RNA mensajero de las GTHs en la pituitaria se desarrolló un método basado en la técnica del Dot-blot, y se empleó para cuantificar los niveles a largo del ciclo reproductor de las lubinas macho.

Se observó que la expresión de las subunidades α , β FSH y β LH permanece activa desde el principio hasta el final del ciclo reproductor de la lubina macho, y que el perfil de las subunidades β FSH y β LH es muy similar, aumentando durante la gametogénesis y alcanzando los máximos niveles durante la época de espermiación. Las tres subunidades de las GTHs aumentan durante la espermatogénesis, paralelamente entre ellas y al aumento del GSI. Esto sugiere que se requieren las tres subunidades para la regulación de los procesos de la gametogénesis y de la maduración gonadal.

La subunidad β FSH se expresa poco al inicio de la espermatogénesis, pero sus niveles de mRNA aumentan continuamente con la progresión del crecimiento gonadal y alcanzan los niveles máximos al comienzo de la espermiación. Este perfil de expresión de la β FSH es similar al descrito en otros peces teleósteos, tales como el Perciforme *Pagrus major* (Gen *et al.*, 2000) o el pleuronectiforme *Paralichthys olivaceus* (Kajimura *et al.*, 2001), en los cuales el mRNA de la β FSH aumenta correlativamente al incremento del GSI, alcanzando la máxima expresión al final de la espermatogénesis. La información de la que se dispone en peces sobre la secreción de la FSH desde la pituitaria indica que ésta sería el principal regulador de la iniciación y el mantenimiento de la espermatogénesis, principalmente mediante el estímulo de la síntesis de esteroides en los testículos (Borg, 1994; Melamed *et al.*, 1998). Trabajos previos en la lubina macho, han demostrado que los perfiles plasmáticos de los andrógenos principales, T y 11KT son correlativos con el crecimiento gonadal, es decir concentraciones bajas al principio de la espermatogénesis que aumentan durante la gametogénesis y alcanzan el pico máximo con la iniciación del período de freza y declinan tras éste (Prat *et al.*, 1990). Estos patrones de la secreción de esteroides se correlacionarían con el perfil observado en la expresión del gen de la β FSH. Se desconoce si, en la lubina, el patrón de la expresión hipofisiaria de la FSH se

correlaciona con la secreción de la FSH, debido a la indisponibilidad de un inmunoensayo de FSH para la lubina u otros peces perciformes. Sin embargo, se ha demostrado en salmónidos, que ese incremento del mRNA hipofisiario de la β FSH durante la espermatogénesis se correlaciona con la secreción y el aumento de los niveles plasmáticos de FSH (Dickey y Swanson, 2000).

Los niveles máximos del mRNA de la β FSH en la lubina macho se alcanzan al principio de la espermiación, pero permanecen altos durante todo este período, y sólo declinan a su finalización. La transcripción activa de la subunidad β FSH durante la espermiación se ha descrito en otros perciformes, tales como el pargo, *P. major* (Gen *et al.*, 2000) y ciprínidos, *C. auratus* (Yoshiura *et al.*, 1997). Estos resultados sugieren que, al menos en estas especies, la hormona FSH también es importante en la regulación de la maduración y la espermiación final del gameto. En otros peces, como los salmónidos, la situación es diferente ya que la expresión hipofisiaria de la β FSH es claramente predominante en la espermatogénesis, durante el comienzo del desarrollo gonadal, y declina durante la freza (Gómez *et al.*, 1999). También es posible que la transcripción activa de la β FSH durante la espermiación sea necesaria para mantener la espermatogénesis en los grupos de gametos con diversos estados de maduración presentes en los testículos de la lubina. De hecho, las hembras de esta especie tienen ovarios sincrónicos por grupos y presentan un período de freza largo, en el que frezan de 2 a 4 veces durante 1 o 2 meses y los machos esperman activamente durante de 3 a 5 meses, con grupos de gametos que sucesivamente entran en espermatogénesis y espermiación (Carrillo *et al.*, 1995a). En los testículos de la lubina macho durante el tiempo que dura la freza, permanecen juntos grupos de espermatozoides inmaduros junto a grupos maduros y se produce la espermatogénesis simultáneamente a la espermiación.

Los niveles de expresión de la subunidad β LH siguen un perfil similar a los de la subunidad β FSH, lo que sugiere que en la lubina, las hormonas FSH y LH están implicadas activamente en la regulación de los procesos reproductivos durante todo el ciclo. La disponibilidad del inmunoensayo de la LH ha permitido observar los movimientos de los niveles de la LH y demostrar que se acumula en la pituitaria

paralelamente al GSI y la expresión de las subunidades α y β LH. La LH y el mRNA de la β LH aumentan gradualmente a lo largo de espermatogénesis y alcanzan el nivel máximo en la espermiación. Se han divulgado resultados similares sobre la expresión génica de la LH y la síntesis de la proteína en otros peces, tales como la trucha arcoiris (Gómez *et al.*, 1999), la carpa dorada (Sohn *et al.*, 1999), la tilapia (Melamed *et al.*, 2000), y la lubina americana (Hassin *et al.*, 1998). En estas especies la síntesis y la secreción de la LH aumentan durante la gametogénesis y son máximas durante la gametogénesis y la freza. Todos estos trabajos apoyan el papel de la LH como regulador principal del final de la maduración gonadal y de la ovulación o la espermiación (Swanson, 1991).

La expresión del gen de la subunidad α es similar a la de las subunidades β FSH y β LH, aumenta durante la gametogénesis hasta el nivel máximo en la espermiación. Aunque un porcentaje desconocido de la expresión del gen de la subunidad α podría corresponder a la síntesis de la hormona tirotrópica (TSH), que comparte la subunidad α común con las GTHs. Es probable que la fluctuación de la expresión de la subunidad α que se observa en nuestro trabajo corresponda a la síntesis paralela de las tres subunidades de las GTHs para conseguir el ensamblaje del dímero de las hormonas maduras de LH y FSH. Estudios anteriores, usando técnicas de hibridación *in situ*, han demostrado que durante el ciclo reproductivo de la trucha arcoiris, los niveles del mRNA de la subunidad α en la pituitaria se incrementan correlativamente con la transcripción activa del gen de la subunidad α en las células gonadotropas (Naito *et al.*, 1991). Sin embargo, no podemos eliminar la posibilidad que los tirotrópos contribuyan al aumento de los niveles del mRNA de la subunidad α . De hecho, se detectan niveles significativos del mRNA de la subunidad α antes de la espermatogénesis y después de la freza, momentos en que la expresión de las subunidades β es muy baja.

Caracterización bioquímica de las gonadotropinas de la lubina

Artículo II: Mateos J, Mañanós E, Carrillo M, Zanuy S. Purification of luteinizing Hormone (LH) and development of a specific Enzyme Like Immunosorbent Assay (ELISA), in the Mediterranean sea bass. *Scientia Marina* (en revisión)

Purificación de la LH de la lubina

Paralelamente a la caracterización molecular de las GTHs, se procedió a purificarlas en forma de hormona natural pura. En éste trabajo, se han empleado procedimientos cromatográficos, para la purificación de la LH de la lubina, similares a los descritos para el aislamiento de las GTHs de los salmónidos (Kawauchi *et al.*, 1989; Swanson *et al.*, 1991) y de la LH de la lubina americana (Mañanós *et al.*, 1997a). Los métodos de análisis bioquímicos han demostrado que con esta técnica se obtienen preparaciones de alta pureza de la LH y de las subunidades α y β LH de la lubina.

El peso molecular de la LH nativa es de 31 Kd y se encuentra dentro del rango de pesos moleculares descritos en otros teleósteos, que van de 27 a 39 Kd (Koide *et al.*, 1993; Mañanós *et al.*, 1997a; Okada *et al.*, 1994; Swanson *et al.*, 1991; Van Der Kraak *et al.*, 1992). La LH de la lubina se fracciona en dos picos mediante rpHPLC en medio ácido, lo que sugiere una sola molécula integrada por dos subunidades. La posición de elución de estos picos es similar a la que se observa para las subunidades α y β de la LH de algunos perciformes (Koide *et al.*, 1993; Mañanós *et al.*, 1997a; Okada *et al.*, 1994), y se acerca a la posición de elución de las subunidades α y β de la LH de salmónidos (Kawauchi *et al.*, 1989; Swanson *et al.*, 1991). La aparición de picos múltiples en los cromatogramas de rpHPLC de las subunidades α y β de la LH refleja una probable variabilidad de la composición de las cadenas glicosiladas. Santos *et al.* (2001) hipotetizaron que estas variaciones pueden tener un significado funcional en las GTHs de la trucha arcoiris, tal y como sucede en los mamíferos, donde los diversos niveles de glicosidación dan lugar a diferentes niveles en la actividad de las GTHs nativas (Chabot *et al.*, 2000; Chopineau *et al.*, 1997). En SDS-PAGE, los picos del rpHPLC aparecen como bandas únicas. La posición de estas bandas corresponde a los pesos moleculares de 12 Kd para la subunidad α y 22 Kd para la subunidad β LH. Estos valores se aproximan a los encontrados en otras especies de peces para las subunidades α y β de la LH, que fluctúan entre los 15 y 22 Kd de la primera y entre 18 y 24 Kd los de la segunda

(Mañanós *et al.*, 1997a; Okada *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1988a; Swanson *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 1993; Van Der Kraak *et al.*, 1992).

Mediante análisis espectrométrico con la técnica de MALDI-TOF, las subunidades α y β de la LH tienen los pesos moleculares respectivos de 12.4 Kd y 15.1 Kd. La diferencia de unos 7 Kd que se observa en el peso molecular de la subunidad β LH de la lubina, entre los análisis por SDS-PAGE y MALDI-TOFF, podría deberse a que la movilidad en función de la masa de las proteínas en SDS-PAGE puede verse alterada por variaciones en la composición de aminoácidos y carbohidratos, lo que daría lugar a una variación entre el peso molecular real y el estimado. Estas variaciones no afectan a los pesos moleculares que se obtienen con la técnica de MALDI-TOFF, que tiene pocos daltons de error ($< 0.1\%$; Karas y Hillenkamp, 1988).

La identidad de las subunidades α y β LH de la lubina purificadas se confirmó comparando las secuencias de los diez primeros aminoácidos del extremo N-terminal con las secuencias de aminoácidos deducidas a partir de la secuencia de nucleótidos de las mismas subunidades clonadas. La secuencia del extremo N-terminal muestra la presencia de un único residuo del aminoácido tirosina en la subunidad α y fenilalanina en la subunidad β LH, sin detectarse contaminación por otros aminoácidos durante los ciclos de secuenciación, lo que implica que se trata de péptidos aislados con un alto grado de pureza.

Durante la purificación no se encontró la FSH de la lubina. Las pituitarias que se emplearon en este trabajo provenían de peces que se encontraban en etapas avanzadas de la gametogénesis y es probable que la concentración de la FSH en el extracto hipofisiario fuese baja. Este hecho concuerda con estudios anteriores de los niveles de la FSH y la LH durante las etapas del ciclo reproductor de varias especies de peces. La FSH es la hormona predominante durante la vitelogénesis y la espermatogénesis en salmónidos, mientras que los niveles de la LH son bajos hasta la ovulación y la espermiación, momentos en que los niveles de la FSH decrecen (Kawauchi *et al.*, 1989; Slater *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1988b; Swanson, 1991). Si en la lubina se produce una situación

similar, la concentración de FSH en las pituitarias que se han empleado podría ser muy baja, con respecto a la LH, lo que ha impedido su detección y posible purificación.

Desarrollo de un ELISA para la LH de la lubina

El ELISA para la cuantificación de la LH de la lubina en plasma y extractos hipofisarios es sensible, específico, rápido y de fácil manipulación. La sensibilidad es de 80 pg/ml, aunque la concentración mínima que desplaza al anticuerpo es de 25 pg/ml. La sensibilidad del ELISA de la LH de la lubina comparada con las de otros inmunoensayos de la LH de peces está dentro de sus rangos y es de las más altas. Las sensibilidades de varios RIAs homólogos de la LH de ciprinidos, salmónidos y perciformes van de 300 pg/ml a 7 ng/ml (Hernández *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 1985; Kobayashi *et al.*, 1987b; Tanaka *et al.*, 1993; Zohar *et al.*, 1990). Las sensibilidades de los ELISAs de LH de peces van de 70 a 156 pg/ml (Kah *et al.*, 1989; Mañanós *et al.*, 1997a; Salbert *et al.*, 1990). El coeficiente de variación (CV) en el mismo análisis (intra-análisis) fluctúa entre el 12 y el 14%, y entre análisis distintos (interanálisis) es del 21%. Estas variaciones son comparables a las que se han divulgado previamente de los RIAs y ELISAs de LH de otras especies de peces, cuyos CV del intra y del interanálisis respectivamente fluctúan del 3 al 8 % y del 6 al 15 % (Hernández *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 1985; Kobayashi *et al.*, 1987b; Mañanós *et al.*, 1997a; Salbert *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1988b; Tanaka *et al.*, 1993).

El ELISA de LH de la lubina se ha validado para medir la LH en plasma y extractos hipofisarios de la lubina. Las curvas de desplazamiento de diluciones seriadas de extractos hipofisarios de la lubina son paralelas a la curva estándar. Lo mismo sucede con los plasmas de animales inyectados con GnRH α , en los que los niveles de la LH son altos. Ahora bien, en machos y hembras inmaduras se pierde el paralelismo, probablemente debido a que los niveles de la LH son bajos y se encuentran más allá del límite de detección del análisis.

También se probó el ELISA de LH de la lubina para cuantificar LH en varias especies de la familia de los Espáridos, y se observó paralelismo con las muestras de extractos de pituitaria y de plasma, lo que permite el uso del análisis en estas especies. El bajo grado de especificidad del ELISA de LH de la lubina probablemente se deba al uso de anticuerpos contra la subunidad β LH. Las subunidades β LH de varias especies de perciformes, entre los que se encuentra la lubina y los Espáridos, son similares (Quérat, 1994), lo que puede explicar porqué los sueros anti- β LHs se pueden utilizar para una amplia gama de especies (Breton *et al.*, 1984).

Efecto del GnRHa sobre la secreción de la LH en lubinas hembras maduras

Tras la purificación de la LH y la puesta a punto del ELISA para detectarla en plasma y pituitaria, realizamos una experiencia para ver como distintas dosis de [D-Ala6, Pro9-Net]-LHRHa (GnRHa), un poderoso análogo sintético de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) que se utiliza para inducir la puesta en las hembras de lubina maduras, influyen sobre la secreción de la LH hipofisiaria al plasma.

La inyección de varias dosis de GnRHa en lubinas hembras maduras produce la elevación de los niveles plasmáticos de la LH. Se observa que las dosis de 25 y 50 μ g son las más potentes para elevar la LH plasmática en todos los puntos de muestreo, probablemente a partir de la dosis de 25 μ g se alcance la máxima capacidad de secreción de la pituitaria de la lubina y dosis mayores produzcan saturación y no sean recomendables con fines prácticos. Se observa que a corto plazo (1.5 h) la dosis de 5 μ g tiene el mismo efecto que dosis mayores, mientras que en muestreos posteriores (3, 6 y 12 h) su capacidad para elevar la LH plasmática es menor. Se puede elucubrar que una dosis baja, al igual que las dosis mayores, podría inducir la movilización inmediata de las reservas de LH de la pituitaria, pero sólo a partir de ciertos niveles (25 μ g) podría mantenerse suficiente GnRHa para inducir también la síntesis de la LH a más largo plazo. En el siguiente apartado vemos que el GnRHa estimula la síntesis de la subunidad β LH en las lubinas inmaduras. La acción de GnRH sobre la expresión de los genes de la LH se

Resumen de Resultados y Discusión

ha estudiado en otros peces, aunque los resultados son diferentes dependiendo de la especie y de la etapa fisiológica en que se encuentran. En la carpa dorada madura sexualmente, la inyección de GnRH α exógeno estimula los niveles α y LH β (Khakoo *et al.*, 1994). Los efectos estimulantes del GnRH sobre el mRNA de LH β también se han comprobado *in vitro*, en cultivos de células hipofisarias de tilapia (Melamed *et al.*, 1998). Nuevas experiencias con más puntos de muestreo y dosis de GnRH α , así como el análisis de la expresión del mRNA y del almacenamiento de la LH en la pituitaria, serían imprescindibles para discernir entre el efecto del GnRH α sobre la síntesis y la secreción de la LH.

Estudio de los mecanismos de retroalimentación de los esteroides sexuales sobre el sistema gonadotropo de la lubina

Artículo III: 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: 21-35.

Artículo IV: Mateos J, Mañanós E, Carrillo M, Zanuy S. (2002) Regulation of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH) Gene Expression, by Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) and Sexual Steroids, in the Mediterranean sea bass. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 132: 75-86.



Efecto de la administración sostenida de testosterona en la lubina prepúbere

Los trabajos preliminares de esta tesis consistieron en el estudio del efecto de la T sobre el GnRH (sGnRH) en la pituitaria y el encéfalo de machos juveniles de lubina, así como su relación con los niveles plasmáticos de esteroides plasmáticos y la actividad gonadal.

Este experimento se llevó a cabo entre noviembre y enero, con machos de lubina de un tamaño comprendido entre 13 y 16 cm, con las gónadas indiferenciadas o que comenzaban a diferenciarse. Un trabajo previo de Blázquez *et al.* (1998b) demostró que los machos juveniles de la lubina cuya longitud corporal es de entre 12.8 y 14.2 cm. comienzan la diferenciación sexual en esta época del año. Los animales se implantaron intraperitonealmente con cápsulas silásticas que contenían placebo o T (100 µg/g de peso corporal) durante 76 días. Los días 0, 15, 30 y 76 tras la implantación se cuantificaron el E₂ y la T plasmática, el contenido en sGnRH del encéfalo completo y la pituitaria y el desarrollo testicular.

Los niveles de T en los machos adultos de la lubina se incrementan a partir de noviembre, y alcanzan los niveles máximos en diciembre y enero durante el período de maduración (Cerdá *et al.*, 1997; Kah *et al.*, 1994; Prat *et al.*, 1990). Los niveles de T que se observan en los machos juveniles controles de este experimento y los machos adultos, son similares. En la primera mitad del experimento y a pesar de que los niveles de la T plasmática son altos, los testículos de los juveniles permanecen indiferenciados o en los primeros estadios de la diferenciación, y contienen solamente espermatogonias aisladas. En la segunda mitad del experimento, se reduce el número de peces indiferenciados y la T plasmática aumenta significativamente. Tomándolos juntos, estos resultados sugieren que la diferenciación gonadal es necesaria previamente al desarrollo de estadios gonadales más avanzados. Se ha postulado que los esteroides pueden ser los inductores naturales de la diferenciación sexual de las gónadas de los peces (Yamamoto, 1969) y que la capacidad de las gónadas para sintetizar andrógenos y estrógenos desde sus precursores no se desarrolla hasta el comienzo de la diferenciación gonadal (Van den Hurk, 1982).

Así se podría asociar el aumento significativo de la T plasmática entre los días 15 y 30 a la culminación de la diferenciación sexual de la lubina macho.

Los niveles de T aumentan 10 veces respecto al control en los animales implantados con este andrógeno y se mantienen altos hasta el final del experimento, a pesar de sufrir una disminución paulatina. La dosis elevada de T consigue avanzar las etapas del desarrollo gonadal, sugiriendo que la T en dosis altas podría acelerar la diferenciación gonadal e incluso podría inducir la espermatogénesis. Estos efectos podrían ser la consecuencia de una acción directa de la T sobre la gónada, tal y como se ha observado en otras especies de teleósteos (Fitzpatrick *et al.*, 1993; Miura *et al.*, 1991). Sin embargo, existe también la posibilidad de que esta inducción de la maduración esté mediada a través de la acción indirecta de la T o de sus metabolitos sobre la pituitaria o el cerebro. Los resultados de este experimento apoyan esta conexión, ya que hay un aumento significativo de los niveles del sGnRH en la pituitaria y el cerebro de los peces implantados con T tras 15 días de tratamiento. Estos resultados sugieren la acción de un mecanismo de retroalimentación positivo de los esteroides gonadales sobre el cerebro y, o la pituitaria de los machos inmaduros de la lubina. Amano *et al.* (1993) obtuvo unos resultados acordes con este mecanismo, encontró que en los machos precoces los niveles del sGnRH hipotalámico y los niveles plasmáticos de IKT y T eran más altos que en que en los machos inmaduros.

Además, el contenido de sGnRH disminuye progresivamente tras la implantación con T. Hay una reducción significativa del contenido de sGnRH paralela a la maduración gonadal de las lubinas macho. Desgraciadamente, cuando este experimento se realizó no estaba disponible un ensayo específico para la LH. Sorbera *et al.* (1997), trabajando en cultivos primarios de células hipofisarias de lubina, observó una influencia positiva a largo plazo de la T sobre la secreción de LH a través de su estimulación por el sGnRH. Yu *et al.* (1991) vio que los machos de la carpa dorada tienen niveles bajos de sGnRH en el cerebro asociados con aumentos de la LH en el suero, lo que sugiere que la liberación del sGnRH puede inducir la secreción de la LH. Kah *et al.* (1994) demostró que el sGnRH cerebral hipofisario de la lubina macho sufre una disminución significativa

durante el periodo de freza y regresa a valores normales posteriormente, lo que probablemente libera la LH al torrente circulatorio para inducir la maduración gonadal. Los resultados experimentales sugieren que la T influye a nivel central sobre el mecanismo que controla la pubertad, afectando a la síntesis y liberación del GnRH, tal y como se ha sugerido en otros teleósteos (Crim y Evans, 1983; Dufour *et al.*, 1983, 1989; Goos *et al.*, 1986; Quérat *et al.*, 1991; Schreibman *et al.*, 1986; Trudeau *et al.*, 1991).

No se conoce el mecanismo de acción de la T en la lubina y aunque no se observan cambios significativos en los niveles plasmáticos de E₂ de los animales tratados con T, no podemos ignorar una posible actuación mediante la aromatización de la T a estrógeno. Tras el tratamiento con esteroides sexuales ha aumentado la GnRH cerebral en truchas juveniles (Goos *et al.*, 1986), *Xiphophorus maculatus* (Schreibman *et al.*, 1986), anguila europea (Dufour *et al.*, 1985), y también la expresión del mRNA de la GnRH en el cerebro del salmón (Amano *et al.*, 1994). Los receptores de estrógenos no se han localizado en neuronas de GnRH, por lo que el efecto de los esteroides sexuales sobre el GnRH podría ser indirecto a través de otros sistemas neuronales como los de la dopamina, el GABA o el neuropéptido Y (Kah *et al.*, 1997; Trudeau, 1997). Ahora bien, el hecho de que los receptores de E₂ no se puedan ver en las neuronas de GnRH de la trucha arcoiris (Navas *et al.*, 1995) no excluye la posibilidad de que en estas células puedan estar presentes receptores de T.

El GnRH predominante en las doradas maduras, tanto machos como hembras, es el sbGnRH, pero el sGnRH también está presente en la hipófisis (Powell *et al.*, 1994b). Y teniendo en cuenta que el sGnRH es más potente que el sbGnRH para inducir la secreción de la LH (Sorbera *et al.*, 1997), es posible que los niveles bajos de sGnRH que se han detectado puedan ser fisiológicamente significativos. Además se sabe que en las pituitarias de los perciformes el sbGnRH suele tener niveles altos y el sGnRH los niveles bajos (Powell *et al.*, 1994b) pero no se sabe nada sobre la ontogenia de estos ratios entre formas de GnRH en animales inmaduros. Así que, pueden existir diferencias entre los animales inmaduros y maduros.

Estos resultados evidencian un mecanismo de retroalimentación positivo a nivel hipofisiario y encefálico en la lubina macho prepúbere. La T acelera la diferenciación gonadal y estimula la espermatogénesis en los machos prepúberes de la lubina a través del sistema GnRH.

Regulación de la expresión génica de la FSH y la LH de la lubina por el GnRH y los esteroides sexuales

Una vez se tuvieron a punto el ELISA para cuantificar la LH en el plasma y la pituitaria y el Dot-blot para analizar la expresión hipofisiaria del RNA mensajero de las subunidades α , FSH β y LH β , se investigó el efecto de los esteroides sexuales y el GnRH sobre la síntesis, acumulación y secreción de las GTHs en la lubina.

En este trabajo demostramos que el mRNA de las GTHs se transcribe durante el período del reposo sexual. En esta época, la subunidad que más se expresa es la α , mientras que los mRNAs de la β FSH y de la β LH se expresan similarmente. La β LH y la β FSH de la lubina americana se expresan en la pituitaria de los peces juveniles y en la de los machos adultos al comienzo de la espermatogénesis (Hassin *et al.*, 1998), siendo más alta la expresión de la β LH que la de la β FSH. En contraste, la expresión de la β FSH es mayor que la de la β LH en salmónidos pregametogénicos (Gómez *et al.*, 1999; Weil *et al.*, 1995), lo que se correlaciona con las fluctuaciones plasmáticas de la FSH y de la LH. Desafortunadamente, no tenemos ningún dato sobre los niveles plasmáticos de la FSH en peces que no sean salmónidos, pero los diversos patrones de la expresión de los genes de las GTHs indican, como han sugerido previamente Elizur *et al.* (1996), diferencias en los patrones de la secreción de la FSH y de la LH entre los perciformes y los salmónidos.

Para investigar los distintos modos de acción de los estrógenos y de los andrógenos sobre la síntesis y secreción de las GTHs, se implantaron lubinas inmaduras con T, E₂ y también DHT, un andrógeno no aromatizable, que puede dar indicaciones de los efectos de la T que no son debido a su aromatización a E₂, ya que se sabe que los peces tienen una actividad aromatasa alta. En este estudio se vio que los estrógenos y los andrógenos

tienen efectos similares sobre las GTHs, ambos estimulan la transcripción del mRNA de la LH e inhiben la de la FSH y que el GnRH α estimula la síntesis y secreción de la LH, pero no de la FSH.

Se utilizaron lubinas jóvenes inmaduras que se encontraban en el periodo de reposo sexual previo a su primer ciclo sexual. En estas condiciones no hay crecimiento gonadal y los niveles de esteroides y LH circulante son bajos. El sexo de los peces empleados no se conocía previamente a la experimentación, pues la lubina no presenta caracteres externos de dimorfismo sexual y estos animales no habían pasado todavía su primer ciclo reproductivo. Así que se procedió a determinar el sexo con posterioridad a la experimentación, mediante el análisis histológico de las gónadas de cada uno de los individuos. Los grupos experimentales se analizaron sin separar los animales por sexos, ya que el cociente entre machos y hembras en todos los grupos era aproximadamente 1:1 y no encontramos ninguna diferencia significativa en las respuestas a los tratamientos entre los sexos. Los niveles basales de los esteroides y la LH del plasma eran similares en todos los peces, sin diferencias entre los sexos, así como su respuesta a la implantación con esteroides.

Tras 12 días de tratamiento con implantes de E₂ o T los niveles plasmáticos del esteroide correspondiente se incrementaron, alcanzando valores similares a los que hay durante la fase de la maduración gonadal final en lubina en un ciclo fisiológico natural. Los niveles en plasma de E₂ y T durante la maduración de las lubinas mantenidas en cautividad son aproximadamente 7-14 ng/ml, dependiendo de las poblaciones (Carrillo *et al.*, 1995b; Mañanós *et al.*, 1997b; Prat *et al.*, 1990), que están en el rango de los niveles de los animales implantados con esteroides durante 12 días en este experimento. Todos los esteroides (E₂, T, DHT) produjeron un incremento de la LH hipofisiaria, indicando una retroalimentación positiva de la síntesis de la LH durante la época de inactividad sexual, tal y como se ha descrito previamente en otras especies de peces (Antonopoulou *et al.*, 1999; Breton y Sambroni, 1996; Breton *et al.*, 1997; Dickey y Swanson, 1998; Dufour *et al.*, 1983; Holland *et al.*, 1998; Saligaut *et al.*, 1992; Saligaut *et al.*, 1998). Por el contrario, tras el tratamiento con esteroides no se alteraron los niveles de la LH en el

plasma, sugiriendo que la síntesis de la LH y su secreción son dos procesos con diferente regulación. Se han obtenido observaciones similares en lubinas americanas juveniles, en las cuales el tratamiento de T elevó el contenido de la LH en la pituitaria pero no afectó a la secreción de la LH (Holland *et al.*, 1998). En nuestro estudio, implantamos a los peces durante 12 días (20 mg/kg BW) y no podemos descartar la posibilidad de que tratamientos más largos o dosis más altas de esteroides podrían inducir la secreción de la LH a más largo plazo, tal y como sucede en la trucha arcoiris, *O. mykiss* (Breton y Sambroni, 1996; Breton *et al.*, 1997). El hecho de que el andrógeno no aromatizable DHT aumentase las reservas de la LH en la pituitaria, sugiere que la síntesis de la LH esté bajo la acción positiva de andrógenos y estrógenos. De tal manera, el efecto de la T podía ser el resultado de su acción como andrógeno y también por la aromatización parcial a E₂.

La inyección de GnRH_a en los peces implantados con placebo elevó los niveles de la LH del plasma, indicando que la lubina durante el periodo de reposo es sensible al estímulo del GnRH_a. La inducción de la secreción de la LH por el GnRH_a no se ve influenciada por el tratamiento previo con esteroides, aunque hubieran provocado un aumento de las reservas de LH en la pituitaria. Lo que indicaría que la inyección de GnRH_a ha inducido la máxima capacidad de secreción de la LH por la pituitaria. En este estudio, y por no sobremanipular a los animales, solo se recogieron muestras de sangre a las 3 y 18 h tras la inyección de GnRH_a, así que no podemos descartar la posibilidad de que las diferencias en los niveles de la LH plasmática entre los grupos implantados con distintos esteroides hayan ocurrido en otros momentos que no hayamos tenido en cuenta. Esta segunda posibilidad se da por el hecho de que la reducción de la LH almacenada en la pituitaria 18 h después de la inyección de GnRH_a, es mayor en los grupos implantados con esteroides que en el implantado con placebo, lo que era particularmente evidente en los peces implantados con T. En otras especies de peces se ha descrito una acción facilitadora de la T sobre la estimulación de la secreción de la LH por el GnRH (Trudeau *et al.*, 1993). Esta posibilidad se podrá investigar en el futuro pero, en el estudio actual enfocado básicamente para observar diferencias en los niveles hipofisarios del mRNA de las GTHs, no deseábamos estresar a los peces con tomas múltiples de muestras entre la

inyección de GnRHa y el sacrificio a las 18h p.i. Por otro parte, se empleó una dosis de 15 µg/kg de GnRHa, ya que, en el experimento del efecto del GnRHa sobre la secreción de la LH en lubinas hembras maduras, se estimulaba de la secreción de la LH con una dosis de 5 µg/kg y a partir de 25 µg/kg se saturaba la respuesta de la pituitaria. Así que se optó por emplear una dosis intermedia.

Es evidente que los esteroides ejercen una retroalimentación positiva sobre la síntesis de la βLH. Los niveles del mRNA de la βLH aumentan con los implantes de T (2.4 veces), también aumentan con el E₂ y la DHT aunque ese aumento es ligero (1.7 veces) y no llega a ser significativo. Mientras, los de la subunidad α no se modifican perceptiblemente por ningún tratamiento de esteroides. En otros peces, tales como la trucha arcoiris (Breton *et al.*, 1997), la T estimula más la síntesis de la βLH que el E₂. Antonopoulou y colaboradores (1999) han demostrado en los salmones atlánticos, *Salmo salar*, una acción doble, androgénica y estrogénica, de la T sobre la estimulación de la síntesis de la βLH. El contenido de la LH en la hipófisis aumenta más con el tratamiento de T que en el tratamiento combinado de T y del inhibidor de la aromatasa ATD. El E₂ y, o la T aumentan los niveles del mRNA de la βLH en la trucha inmadura (Trinh *et al.*, 1986), la anguila europea (*A. anguilla*: Quérat *et al.*, 1991), el salmón (*O. tshawytscha*: Xiong *et al.*, 1994b; *O. kisutch*: Dickey y Swanson, 1998), la carpa dorada (*C. auratus*: Huggard *et al.*, 1996) y en cultivos celulares de pituitaria de anguila (Huang *et al.*, 1997). En todos estos estudios, y en el nuestro, las diferencias que se presentan en el grado de estímulo de los esteroides y en las distintas acciones del E₂ y la T, pueden ser reflejo de diferencias interespecíficas y, o variaciones debidas al estado fisiológico de los peces. Los estudios en salmónidos han demostrado que los efectos estimulantes de la T y el E₂ sobre el mRNA de la βLH varían a lo largo del año, siendo significativos en inmaduros, leves en maduro y nulos durante la freza (Xiong *et al.*, 1994b). Estos autores han descrito una acción directa de los esteroides en la pituitaria, sobre el ERE del Gen de la βLH, y la influencia que tiene sobre el promotor de la βLH durante el estado de maduración.

Con este estudio, no podemos decir si el efecto estimulante de los esteroides sobre la transcripción de la β LH es a nivel de la pituitaria, el hipotálamo o ambos. Se sabe que los estrógenos actúan directamente sobre la célula gonadotropa a través de EREs que activan el promotor del gen de la β LH y por tanto su transcripción (Le Dréan *et al.*, 1996). En la célula gonadotropa, los esteroides también pueden estimular la transcripción de otros genes que se sabe que influyen sobre la sensibilidad de los gonadotropos a otros factores estimulantes, tales como los receptores de GnRH (Habibi *et al.*, 1989). Además, los esteroides pueden actuar en el cerebro, mediante el estímulo directo o indirecto del sistema de GnRH (Montero *et al.*, 1996) o de otras neuronas que tienen actividad gonadotropa, tales como la dopamina, el NPY o el GABA (Kah *et al.*, 1997). Por el momento en la lubina, no hay más información disponible a este respecto, aunque lo más probable es que se produzca una combinación de varios mecanismos de acción, lo que da lugar a un complejo mecanismo de regulación por los esteroides de la función gonadotropa.

En contraste todos los esteroides inhibieron los niveles del mRNA de la subunidad β FSH. El E_2 demostró la acción inhibitoria más potente sobre las transcripciones de la β FSH (10 veces), aunque es evidente una inhibición androgénica por la acción de la DHT (3 veces). Estos resultados son unos de los primeros sobre la regulación de la síntesis de la FSH en peces no salmónidos. En salmónidos, el tratamiento de la T ejerce una retroalimentación negativa sobre los niveles hipofisarios y plasmáticos de la β FSH (Antonopoulou *et al.*, 1999; Dickey y Swanson, 1998; Larsen y Swanson, 1997; Saligaut *et al.*, 1998). Estos resultados se han utilizado para explicar que durante el ciclo reproductivo de la trucha arcoiris, la elevación de los niveles de plasmáticos del E_2 coinciden con la declinación de los niveles plasmáticos de la FSH; del mismo modo, el mRNA de la β FSH también disminuye en los períodos en que los niveles de esteroides en el plasma permanecen altos (Gómez *et al.*, 1999). El tratamiento con E_2 no tiene ningún efecto sobre los niveles plasmáticos de FSH y el mRNA de β FSH en individuos inmaduros de *O. kisutch* (Dickey y Swanson, 1995) y hembras en recrudescencia temprana (Swanson y Dickey, 1996), pero inhibe el mRNA de β FSH de los machos en la

recrudescencia temprana y disminuye la FSH plasmática de las hembras vitelogénicas (Swanson y Dickey, 1996). Por contra, los esteroides ejercen una acción positiva sobre los niveles hipofisarios y, o plasmáticos de la FSH en la trucha arcoiris inmadura (Breton *et al.*, 1997) y el Salmón atlántico (Borg *et al.*, 1998). Una acción inhibitoria de los estrógenos sobre los niveles de mRNA de β FSH se ha descrito en la carpa dorada (Sohn *et al.*, 1998b). Así, parece que los esteroides ejercen una retroalimentación negativa predominantemente sobre la secreción de la FSH en los peces, aunque su acción es compleja y puede variar entre especies y estados fisiológicos, como se ha sugerido previamente en salmónidos (Antonopoulou *et al.*, 1999). También, los diversos resultados entre los estudios pueden deberse a variaciones en las condiciones experimentales, tales como las dosis de esteroides utilizadas y el modo de administración.

La inyección de GnRH α en las lubinas implantadas con placebo estimula la transcripción de las subunidades α y β LH, pero no tiene ninguna consecuencia en los niveles del mRNA de la β FSH. Estos efectos son independientes del tratamiento esteroideo, aunque es digno de mención que los peces implantados con T e inyectados con GnRH α alcanzaron los mayores niveles de transcripción de mRNA de las subunidades α y β LH. Este estudio demuestra que el GnRH α tiene una acción estimulante sobre la síntesis de la LH durante el período de inactividad sexual de la lubina. Semejante a nuestros datos, los estudios realizados en *M. saxatilis* han mostrado que la regulación de la transcripción de la LH y de FSH por el GnRH α es diferente. La inyección de GnRH α (20 g/kg) en juveniles de *M. saxatilis* estimula, 9 h después de la inyección, la expresión de las subunidades α y β LH, y levemente la de β FSH (Hassin *et al.*, 1995). Estos mismos autores observaron un aumento de la transcripción del mRNA α y β LH en machos espermatogénicos de *M. saxatilis* a las 6 h posteriores de la inyección de GnRH α (100 g/kg), mientras que la transcripción de β FSH aumentó sólo de forma leve y a las 24 h p.i. (Hassin *et al.*, 1998). En nuestro estudio, aunque no vimos ningún efecto del GnRH α sobre el mRNA de β FSH a las 18 h p.i., no podemos descartar algún efecto a tiempos anteriores o posteriores, o en otros momentos del ciclo reproductivo. La acción del GnRH sobre la expresión de los genes de las GTHs se ha estudiado en otros peces, aunque los

resultados son diferentes dependiendo de la especie y del estado fisiológico. El tratamiento de doradas adultas con diversos GnRHs no modificó la expresión de los genes de la β FSH y de la β LH a las 8 y 24 h.p.i. (Elizur *et al.*, 1995). La inyección de GnRH α en salmones machos recrudescientes elevó el mRNA de β FSH pero no la transcripción de la β LH (Swanson y Dickey, 1996). En carpas doradas maduras, el GnRH α estimuló los niveles del mRNA de α y β LH (Khakoo *et al.*, 1994), igual que en nuestros animales. El efecto estimulante del GnRH sobre el mRNA de la β LH también se ha publicado en trabajos *in vitro* con células de pituitaria de tilapia (Melamed *et al.*, 1998). Parece claro, por el nuestro y otros estudios anteriores, que la transcripción de los genes de FSH y LH tiene diferente regulación por el GnRH α , pero que varía dependiendo de la especie y del momento del ciclo sexual. Las diferencias en la acción estimulante del GnRH sobre la secreción de la FSH y la LH, dependiendo de la etapa reproductiva de los peces, se han demostrado en la trucha arcoiris (Breton *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta lo que ha sido sugerido en mamíferos, la diferente regulación de la expresión de los genes de la FSH y de la LH por el GnRH en las células gonadotropas se pueden explicar por variaciones en la densidad de los receptores del GnRH y, o la activación de diversos mecanismos de transducción de señal (Kaiser *et al.*, 1995).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La lubina posee dos gonadotropinas, la FSH y la LH, compuestas por dos subunidades. La subunidad α , que es común en la FSH y la LH, y la subunidad β , que es específica de cada gonadotropina y por tanto son dos, la β FSH y la β LH.
2. Los estudios de la evolución molecular de las secuencias de las GTHs de vertebrados, que incluyen las secuencias de la lubina, indican que la subunidad α está más conservada que las subunidades β de las GTHs. La subunidad β FSH ha divergido más rápidamente durante la evolución de los teleósteos y es más específica que la subunidad β LH.
3. Los estudios filogenéticos, en los que se han incluido las secuencias de las GTHs de la lubina, indican que las subunidades β de las GTHs de vertebrados se separan en dos linajes monofiléticos, uno que agrupa a las FSHs de peces y vertebrados y otro linaje para las LHs de los peces junto con las de otros vertebrados. Lo que apoya la homología entre la FSH de los peces y la FSH de los tetrápodos y la LH de los peces con la LH de los tetrápodos.
4. En los machos de lubina, la expresión de las subunidades α , β FSH y β LH aumenta durante la espermatogénesis paralelamente al aumento del GSI. Las subunidades β FSH y β LH alcanzan los máximos niveles durante la época de espermiación.
5. Se han obtenido preparaciones de la LH de la lubina con un alto grado de pureza mediante extracción con etanol, cromatografía de exclusión molecular en Superdex-G100, cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sepharose y cromatografía de exclusión molecular en Superdex-75. Las subunidades de la LH, α y β , se aislaron mediante rpHPLC.



Conclusiones

6. Se ha desarrollado un ELISA específico para la medida de la LH en la lubina, con una sensibilidad de alrededor de 0.65 ng/ml y unos coeficientes de variación de intra e interensayo del 11.7% y 11%, respectivamente. Este ELISA se ha validado para el análisis de la LH en varias especies de Espáridos.
7. Se ha logrado estimular de manera significativa la secreción de la LH al plasma en lubinas hembras maduras mediante administración de GnRHa. Produciéndose saturación en la respuesta de la pituitaria a partir de la dosis de 25 µg/Kg.
8. La implantación de T acelera la diferenciación gonadal y estimula la espermatogénesis en la lubina macho prepúbere. Al mismo tiempo y de manera correlacionada aumenta el contenido del sGnRH en el cerebro y la pituitaria. Esto sugiere que la T puede estar implicada en el inicio de la pubertad, actuando probablemente a través de una retroalimentación positiva sobre el GnRH
9. La implantación de esteroides (T, E₂ y DHT) en lubinas inmaduras elevan los niveles de estos esteroides a cifras similares a las que se observan en las etapas finales de la maduración gonadal de la lubina (pico anual máximo).
10. La implantación de esteroides (T, E₂ y DHT) en lubinas inmaduras ejerce una acción positiva de retroalimentación sobre la LH, aumentando el contenido hipofisiario de la LH y los niveles hipofisarios del mRNA de la LH y una fuerte retroalimentación negativa sobre el mRNA hipofisiario de la FSH.
11. El GnRHa estimula los niveles hipofisarios del mRNA de la LH y la secreción de la LH al plasma en lubinas inmaduras, en cambio no tiene ningún efecto sobre los niveles del mRNA hipofisiario de la FSH.

Conclusiones

12. Estos datos en conjunto sugieren la homología filogenética y fisiológica entre la FSH y la LH de la lubina con la FSH y la LH de tetrápodos.

BIBLIOGRAFÍA

(Correspondiente a los apartados de Introducción,
Resumen de Resultados y Discusión)

BIBLIOGRAFÍA

- Adams BA, Vickers ED, Warby C. Three forms of gonadotropin-releasing hormone, including a novel form, in a basal salmonid, *Coregonus clupeaformis*. Biol Reprod 2002; 67:232-239.
- Amano M, Aida K, Okumoto N, Hasegawa Y. Changes in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in the brain and pituitary, and GTH contents in the pituitary in female masu salmon, *Oncorhynchus masou*, from hatching through ovulación. Zool Sci 1992; 9:375-386.
- Amano M, Aida K, Okumoto N, Hasegawa Y. Changes in levels of GnRH in the brain and pituitary and GTH in the pituitary in male masu salmon, (*Onchorhynchus masou*), from hatching to maturation. Fish Physiol Biochem 1993; 11:233-240.
- Amano M, Hyodo S, Urano A, Okumoto N, Kitamura S, Ikuta K, Suzuki Y, Aida K. Activation of salmon gonadotropin-releasing hormone synthesis by 17-alpha-methyltestosterone administration in yearling masu salmon, *Onchorhynchus masou*. Gen Comp Endocrinol 1994; 95:374-380.
- Andersson E, Borg B, Lambert JG. Aromatase activity in brain and pituitary of immature and mature Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. Gen Comp Endocrinol 1988; 72:394-401.
- Antonopoulou E, Swanson P, Mayer I, Borg B. Feedback control of gonadotropins in Atlantic salmon, *Salmo salar*, male parr. II. Aromatase inhibitor and androgen effects. Gen Comp Endocrinol 1999; 114:142-150.
- Arey BJ, Stevis PE, Deecher DC, Shen ES, Frail DE, Negro-Vilar A, Lopez FJ. Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing pleiotropic actions of FSH isoforms. Mol Endocrinol 1997; 11:517-526.
- Arnold CJ, Liu C, Lindau-Shepard B, Losavio ML, Patrascu MT, Dias JA. The human follitropin alpha-subunit C terminus collaborates with a beta-subunit cystine noose

Bibliografía

- and an alpha-subunit loop to assemble a receptor-binding domain competent for signal transduction. *Biochemistry* 1998; 37(7):1762-1768.
- Asturiano JF, Sorbera LA, Ramos J, Kime DE, Carrillo M, Zanuy S. Hormonal regulation of the European sea bass reproductive cycle: and individualized female approach. *J Fish Biol* 2000; 56:1155-1172.
- Asturiano JF, Sorbera LA, Ramos J, Kime DE, Carrillo M, Zanuy S. Group-synchronous ovarian development, ovulación and espermiación in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenesis. *Scientia Marina* 2002; 66:273-282.
- Baenzinger JU. (1994). Glycosylation and glycoprotein hormone function. In: Lustbader JW, Puett D, Ruddon RW (Eds) *Glycoprotein Hormones: Structure, Function and Clinical Implications*. Springer-Verlag, New York, pp 167-174
- Barnabé G, Billard R. (1984) *L'Aquaculture du bar et des Sparidés*. INRA Publications, Versailles.
- Barry TP, Santos AJG, Furukawa K, Aida K, Hanyu I. Steroid profiles during spawning in male common carp. *Gen Comp Endocrinol* 1990; 80:223-231.
- Baynes SM, Scott AP. Seasonal variations in parameters of milt production and in plasma concentrations of sex steroids of male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen Comp Endocrinol* 1985; 57:150-160.
- Beato M, Herrlich P, Schütz G. Steroid hormone receptors: Many actors in search of a plot. *Cell* 1995; 83:851-857.
- Beitins IZ, Padmanabhan V. Bioactivity of gonadotropins. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1991; 20:85-120.
- Billard R, Richard M, Breton B. Stimulation of gonadotropin secretion after castration in rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 1977; 33:163-165.
- Billard R, Fostier A, Weil C, Breton B. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canad J Fish Aquat Sci* 1982; 39:65-79.
- Blázquez M, Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, Donaldson EM. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L) aquaculture: effects of

Bibliografía

- dietary 17 ex-methyl- testosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture* 1995; 135:329-342.
- a Blázquez M, Bosma PT, Fraser EJ, Van Look KJW, Trudeau VI. GFIs as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. *Com Biochem Physiol* 1998; 199C:325-364.
- b Blázquez M, Zanuy S, Carrillo M, Piferrer F. Effects of rearing temperatures on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). *J Exp Zool* 1998; 281:207-216.
- Blüm V. (1985). *Vertebrate reproduction*. Springer-Verlag, New York.
- Bogerd J, Li KW, Janssen-Dommerholt J, Goos HJTh. Two gonadotropin-releasing hormones from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187:127-134.
- Bommelaer MC, Billard R, Breton B. 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.). *Reprod Nutr Develop* 1981; 21:989-997.
- Bon E, Breton B, Govoroun MS, Le Menn F. Effects of accelerated photoperiod regimes on the reproductive cycle of the female rainbow trout: II seasonal variations of plasma gonadotropins (GTH I and GTH II) levels correlated with ovarian follicle growth and egg size. *Fish Physiol Biochem* 1999; 20:143-154.
- Borg B. Seasonal effects of photoperiod and temperature on espermatogénesis and male secondary sexual characters in the three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus* L. *Can J Zool* 1982; 60:3377-3386.
- Borg B, Reschke M, Peute J, Van den Hurk R. Effects of castration and androgen treatment on pituitary and testes of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., in the breeding season. *Acta Zool* 1985; 66:47-54.
- Borg B, Paulson G, Peute J. Stimulatory effects of methyltestosterone on pituitary gonadotropic cells and testes leydig cells of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., in winter. *Gen Comp Endocrinol* 1986; 62:54-61.

Bibliografia

- Borg B, Andersson E, Mayer I, Zandbergen MA, Peute J. Effects of castration on pituitary gonadotropic cells of the male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L., under long photoperiod in winter: indications for a positive feedback. *Gen Comp Endocrinol* 1989; 76:12-18.
- Borg B, Antonopoulou E, Anderson E, Carlberg T, Mayer I. Effectiveness of several androgens in stimulating kidney hypertrophy, a secondary sexual characters, in castrated male three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Can J Zool* 1993; 71:2327-2329.
- Borg B. Androgens in teleosts fishes. *Comp Biochem Physiol* 1994; 109C:219-245.
- Borg B, Antonopoulou E, Mayer I, Andersson E, Berglund I, Swanson P. Effects of gonadectomy and androgen-treatments on pituitary and plasma levels of gonadotropins in Atlantic salmon, *Salmo salar*, mature male parr - Physiological positive feedback control of both gonadotropins. *Biol Reprod* 1998; 58:814-820.
- Breton B, Zohar Y. Dosages radioimmunologiques heterologues de gonadotropines de type glycoproteiques maturantes de poissons teleostes. *Aquaculture* 1984; 40:307-323.
- Breton B, Mikolajczyk T, Popek W. (1993). The neuroendocrine control of the gonadotropin (GtH2) secretion in teleost fish. In: Lalloo B, Vitello (Eds) *Aquaculture: Fundamental and applied reseach*. American Geophysical Union, pp 199-215.
- Breton B, Sambroni E. Steroid activation of fore brain-pituitary complex gonadotropic function in the triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 1996; 101:155-164.
- Breton B, Sambroni E, Govoroun M, Weil C. Effects of steroids on GTH I and GTH II secretion and pituitary concentration in the immature rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *C R Acad Sci Paris Life Sci* 1997; 320:783-789.
- Breton B, Govoroun M, Mikolajczyk T. GTH I and GTH II secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary responsiveness to GnRH-A stimulation. *Gen. Com. Endocrinol.* 1998; 111:38-50.

Bibliografía

- Burnside J, Buckland PR, Chin WW. Isolation and characterization of the gene encoding the alpha-subunit of the rat pituitary glycoprotein hormones. *Gene* 1988; 70:67-74.
- Burzawa-Gérard E, Fontaine YA. The gonadotropin of lower vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 1972; 3:715-728.
- Burzawa-Gérard E. Chemical data on the pituitary gonadotropins and their implication to evolution. *Canad J Fish Aquat Sci* 1982; 39:80-91.
- a Callard GV, Petro Z, Ryan KJ. Biochemical evidence for aromatization of androgen to estrogen in the pituitary. *Gen Comp Endocrinol* 1981; 44:359-364.
- b Callard GV, Petro Z, Ryan KJ. Estrogen synthesis in vitro and in vivo in the brain of a marine teleost (*Myoxocephalus*). *Gen Comp Endocrinol* 1981; 43:243-255.
- Callard GV. Androgen and estrogen actions in the vertebrate brain. *Am Zool* 1983; 23:607-620.
- Carolsfeld J, Powell JF, Park M. Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, from an ancient teleost, herring. *Endocrinology* 2000; 141:505-512.
- a Carrillo M, Zanuy S, Prat F, Cerdá J, Ramos H, Mañanós E, Bromage N. (1995). Sea bass. In: Bromage NR, Roberts J (Eds) *Broodstock management and egg and larval quality*. Blackwell Science, London, pp 138-168.
- b Carrillo M, Zanuy S, Pral F, Cerdá J, Mañanós B, Bromage N, Ramos J, Kah O. Nutritional and photoperiodic effects on hormonal cycles and quality of spawning in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). *Neth J Zool* 1995; 45(1-2):204-209.
- Cerdá J, Zanuy S, Carrillo M. Evidence for dietary effects on plasma levels of sexual steroids during spermatogenesis in the sea bass. *Aquacult Int* 1997; 5:473-477.
- Cerdá-Reverter JM, Sorbera LA, Carrillo M, Zanuy S. Energetic dependence of NPY-induced LH secretion in a teleost fish (*Dicentrarchus labrax*). *Amer J Physiol* 1999; 277:1627-1634.
- a Cerdá-Reverter JM, Anglade I, Martínez-Rodríguez G, Mazurais D, Muñoz-Cueto JA, Carrillo M, Kah O, Zanuy S. Characterization of neuropeptide Y expression in the

Bibliografía

- brain of a perciform fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2000; 19:197-210.
- b Cerdá-Reverter JM, Martínez-Rodríguez G, Anglade I, Kah O, Zanuy S. Peptide YY (PYY) and fish pancreatic peptide Y (PY) expression in the brain of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as revealed by in situ hybridization. *Journal of Comparative Neurology* 2000; 426:197-208.
- Copeland PA, Thomas P. Control of gonadotropin release in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): evidence for lack of dopaminergic inhibition. *Gen Comp Endocrinol* 1989; 74:474-483.
- Copeland PA, Thomas P. Isolation of gonadotropin subunits and evidence for two distinct gonadotropins in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Gen Comp Endocrinol* 1993; 91:115-125.
- Counis R, Dufour S, Ribot G, Quérat B, Fontaine Y-A, Jutisz M. Estradiol has inverse effects on pituitary glycoprotein α -subunit messenger ribonucleic acid in the immature European eel and the gonadectomized rat. *Endocrinology* 1987; 121:1178-1184.
- Crim LW, Peter RE. The influence of testosterone implantation in the brain and pituitary on pituitary gonadotropin levels in Atlantic salmon parr. *Ann Biol Anim Biochem Biophys* 1978; 18:689-694.
- Crim LW, Evans DM. Stimulation of pituitary gonadotropin by testosterone in juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen Comp Endocrinol* 1979; 37:192-196.
- Crim LW, Peter RE, Billard R. Onset of gonadotropic hormone accumulation in the immature trout pituitary gland in response to estrogen or aromatizable androgen steroid hormones. *Gen Comp Endocrinol* 1981; 44:374-381.
- Crim LW, Billard R, Genge PD, Idler DR. The influence of immature gonads on onset of gonadotropic hormone accumulation in the juvenile rainbow trout pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol* 1982; 48:161-166.
- Crim LW, Evans DM. Influence of testosterone and/or luteinizing hormone releasing hormone analogue on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout. *Biol Reprod* 1983; 29:137-142.

Bibliografía

- Cyr DG, Eales JG. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 1996; 6:165-200.
- Chabot V, Magallon T, Taragnat C, CombrRNAous Y. Two free isoforms of ovine glycosidación hormone α -subunit strongly differ in their ability to stimulate prolactin release from foetal pituitarias. *J Endocrinol* 2000; 164:287-297.
- Chang JP, Yu KL, Wong AO, Peter RE. Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release in vitro in goldfish. *Neuroendocrinology* 1990; 51:664-674.
- Chang YS, Huang CJ, Huang FL, Liu CS, Lo TB. Purification, characterization, and molecular cloning of gonadotropin subunits of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Gen Comp Endocrinol* 1990; 78:23-33.
- Chang YS, Huang FL, Lo TB. Isolation and sequence analysis of carp gonadotropin β -subunit gene. *Mol Mar Biotechnol* 1992; 1:97-105.
- Chopineau M, Maritain N, Marichatou H, Troispoux C, Auge-Gouillou C, Stewart F, CombrRNAous Y, Guillou F. Evidence that the α -subunit influences the specificity of receptor binding of the equine gonadotropins. *J Endocrinol* 1997; 155:241-245.
- Danger JM, Breton B, Vallarino M, Fournier A, Pelletier G, Vaudry H. Neuropeptide-Y in the trout brain and pituitary: localization, characterization, and action on gonadotropin release. *Endocrinology* 1991; 128:2360-2368.
- de Leeuw R, Smit-van Dijk W, Zigterman JW, Van der Loo JC, Lambert JG, Goos HJ. Aromatase, estrogen 2-hydroxylase, and catechol-O-methyltransferase activity in isolated, cultured gonadotropic cells of mature African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Gen Comp Endocrinol* 1985; 60:171-177.
- de Leeuw R, Wurth YA, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJT. The effects of aromatizable androgens, non-aromatizable androgens, and estrogens on gonadotropin release in castrated African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Cell Tissue Res* 1986; 243:587-594.
- Dickey JT, Swanson P. (1995). Development of RNase protection assays for quantification of gonadotropin (GTH I and GTH II) subunit transcript levels in coho

Bibliografía

- salmon (*Oncorhynchus kisutch*). In: Goetz FW, Thomas P (Eds). Proceedings of the Fifth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Austin, pp 28.
- Dickey JT, Swanson P. Effects of salmon gonadotropin-releasing hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen Comp Endocrinol* 2000; 118:436-49.
- Dickey JT, Swanson P. Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kitsutch*). *J Mol Endocrinol* 1998; 21:291-306.
- Dinshaw JP. A clasped embrace. *Nature* 1994; 369:438-439.
- Donaldson EM, Hunter GA. (1983). Induced final maturation, ovulación and espermiación in cultured fish. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Eds) *Fish Physiology*. Academic Press, New York, Vol. IX B, chap 7.
- Dufau ML. The luteinizing hormone receptor. *Annu Rev Physiol* 1998; 60:461-496.
- Dufour S, Delerue-Le Belle N, Fontaine YA. Effects of steroid hormones on pituitary immunoreactive gonadotropin in European freshwater eel, *Anguilla anguilla* L. *Gen Comp Endocrinol* 1983; 52:190-197.
- Dufour S, Fontaine YA, Kerdelhue B. Increase in brain and pituitary radioimmunoassayable gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the European silver eel treated with sexual steroid or human chorionic gonadotropin. *Neuropeptides* 1985; 6:495-502.
- Dufour S, Le Belle N, Balonche S, Fontaine YA. Positive feedback control by the gonads on gonadotropin (GTH) and gonadoliberin (GnRH) levels in experimentally matured female silver eels, *Anguilla anguilla* L. *Fish Physiol Biochem* 1989; 7:157-162.
- Dufour S, Montero M, Le Belle N, Bassompierre M, King JA, Millar RP, Peter RE, Fontaine YA. Differential Distribution and Response to Experimental Sexual Maturation of 2 Forms of Brain Gonadotropin-Releasing Hormone (Gnrh) in the European Eel, *Anguilla anguilla*. *Fish Physiol Biochem* 1993; 11:99-106.
- Edey M, Young G, Bern HA, Steiny S. Prolactin receptors in tilapia (*Sarotherodon mossambicus*) tissues: binding studies using 125I-labeled ovine prolactin. *Gen Comp Endocrinol*. 1984; 56:19-23.

- Elizur A, Meiri I, Rosenfeld H, Zmora N, Knibb WR, Zohar Y. (1995). Seabream gonadotropins: sexual dimorphism in gene expression. In: Goetz FW, Thomas P (Eds) Proceedings of the Fifth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. University of Texas, Austin, pp 13-15.
- Elizur A, Zmora N, Rosenfeld H, Meiri I, Hassin S, Gordin H, Zohar Y. Gonadotropins β -GTH I and β -GTH II from gilthead seabream, *Sparus aurata*. Gen Comp Endocrinol 1996; 102:39-46.
- Feng W, Matzuk MM, Mountjoy K, Bedows E, Ruddon RW, Boime I. The asparagine-linked oligosaccharides of the human chorionic gonadotropin β subunit facilitate correct disulfide bond pairing. J Biol Chem 1995; 270:11851-11859.
- Fernald RD, White RB. Gonadotropin-releasing hormone genes: Phylogeny, structure, and functions. Front Neuroendocrin 1999; 20:224-240.
- Fevold HL, Hisaw FL, Leonard SL. The gonad stimulating and the luteinizing hormones of the anterior lobe of the pituitary. Am J Physiol 1931; 109:655-665.
- Fiddes JC, Goodman HM. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. J Mol Appl Genet 1981; 1:3-18.
- Fitzpatrick MS, Var Der Kraak G, Schreck CB. Profiles of plasma sex steroids and gonadotropin in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during final maturation. Gen Comp Endocrinol 1986; 62:437-451.
- Fitzpatrick MS, Pereira CB, Schreck CB. In vitro steroid secretion during early development of mono-sex rainbow trout: sex differences, onset of pituitary control, and effects of dietary steroid treatment. Gen Comp Endocrinol 1993; 91:199-215.
- Fontaine YA, Burzawa-Gérard E. Esquisse de l'évolution des hormones gonadotropes et thyroïdiques des Vertébrés. Gen Comp Endocrinol 1977; 32:341-347.
- Fontaine YA, Dufour S. (1987). Current status of LH-GTH-1-like gonadotropin in fish. In: Idler DR, Crim LW, Walsh JW (Eds). Proceedings of the Third International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. St John's Newfouland, Canada, pp 48-56.

Bibliografía

- Forniés MA, Mañanós E, Carrillo M, Rocha A, Laureau S, Mylonas CC, Zohar Y, Zanuy S. Spawning induction of individual European sea bass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture* 2001; 202:221-234.
- Forniés MA, Carrillo M, Mañanós E, Sorbera LA, Zohar Y, Zanuy S. Relative potency of the forms of GnRH and their analogs on LH-release in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J Fish Biology* 2004; 63:73-89.
- Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B, Zohar Y. (1983). The gonadal steroids. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Eds) *Fish Physiology*. Academic Press, New York, Vol. XIA, pp 277-372.
- Fostier A, Le Gac F, Loir M. (1987). Steroids in male reproduction. In: Idler DR, Crim LW, Walsh JW (Eds). *Proceedings of the Third International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. St John's Newfouland, Canada, pp 48-56. 239-245.
- Fox KM, Dias JA, Van Roey P. Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Mol Endocrinol* 2001; 15:378-389.
- Garcia-Hernandez MP, Koide Y, Diaz MV, Kawauchi H. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* (Riso, 1810). *Gen Comp Endocrinol* 1997; 106:389-399.
- Ge W, Gallin WJ, Strobeck C, Peter RE. Cloning and sequencing of goldfish activin subunit genes: strong structural conservation during vertebrate evolution. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193:711-717.
- Ge W, Peter RE. Evidence for Non-Steroidal Gonadal Regulator(S) of Gonadotropin Release in the Goldfish, *Carassius auratus*. *Zoological Science* 1994; 11:717-724.
- Gelinas D, Callard GV. Immunolocalization of aromatase- and androgen receptor-positive neurons in the goldfish brain. *Gen Comp Endocrinol* 1997; 106:155-168.
- Gen K, Maruyama O, Kato T, Tomizawa K, Wakabayashi K, Kato Y. Molecular cloning of cDNA s encoding two types of gonadotropin α subunit from the masu salmon, *Oncorhynchus masou*: construction of specific oligonucleotides for the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunits. *J Mol Endocrinol* 1993; 11:265-273.

Bibliografía

- Gen K, Okuzawa K, Senthilkumaran B, Tanaka H, Moriyama S, Kagawa H. Unique expression of gonadotropin-I and II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. *Biol Reprod* 2000; 63:308-319.
- Gharib SD, Bowers SM, Need LR, Chin WW. Regulation of rat luteinizing hormone subunit mRNAs by gonadal steroid. *J Clin Invest* 1986; 77:582-589.
- Gharib SD, Roy A, Wierman ME, Chin WW. Isolation and characterization of the gene encoding the beta-subunit of rat follicle-stimulating hormone. *DNA* 1989; 8:339-349.
- Gómez JM, Weil C, Ollitrault M, Le Bail P-Y, Breton B, Le Gac F. 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* 1999; 113:413-428.
- González-Martínez D, Madigou T, Zmora N. Differential expression of three different prepro-GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Comp Neurol* 2001; 429:144-155.
- Goos HJTh, de Leeuw R, Cook H, Van Oordt PGWJ. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) bioactivity in the brain of the immature rainbow trout, *Salmo gairdnerii*: the effect of testosterone. *Gen Comp Endocrinol* 1986; 64:80-84.
- Goos HJT. (1987). Steroid feedback on pituitary gonadotropin secretion. In: Idler DR, Crim LW, Donaldson EM (Eds) *Reproductive Physiology of Fish*. University of Newfoundland, St John's, Canada. pp 16-20.
- Gorbman A. Olfactory origins and evolution of the brain-pituitary endocrine system: Facts and speculation. *Gen Comp Endocrinol* 1995; 97:171-178.
- Gothilf Y, Muñoz-Cueto JA, Sargillo CA. Three forms of gonadotropin-releasing hormone in a perciform fish (*Sparus aurata*): complementary deoxyribonucleic acid characterization and brain localization. *Biol Reprod* 1996; 55:636-645.
- Govoroun MS, Huet JC, Pernollet JC, Breton B. Use of immobilized metal ion affinity chromatography and dye-ligand chromatography for the separation and purification of rainbow trout gonadotropins, GTH I and GTH II. *J Chromatogr* 1997; 698B:35-46.

Bibliografia

- Habibi HR, De Leeuw R, Nahorniak CS, Goos HJTh, Peter RE. Pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor activity in goldfish and catfish: seasonal and gonadal effects. *Fish Physiol Biochem* 1989; 7:109-118.
- Habibi HR, Peter RE. (1991). Gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptors in teleost. In: Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS (Eds) *Proceedings of the Fourth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Sheffield, pp 109-113.
- Hassin S, Elizur A, Zohar Y. Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotropin-I and -II subunits. *J Mol Endocrinol* 1995; 15:23-35.
- Hassin S, Gothilf Y, Blaise O, Zohar Y. Gonadotropin-I and -II subunit gene expression of male striped bass (*Morone saxatilis*) after gonadotropin-releasing hormone analogue injection: quantitation using an optimized ribonuclease protection assay. *Biol Reprod* 1998; 58:1233-1240.
- Heikoop JC, Van den Boogaart P, de Leeuw R, Mulders JW, Grootenhuis PD. Partially deglycosylated human choriogonadotropin, stabilized by intersubunit disulfide bonds, shows full bioactivity. *Eur J Biochem* 1998; 253:354-356.
- Hernández MPG, Ayala AG, Agulleiro B, Garcia A, Van Dijk W, Schulz RW. Development of a homologous radioimmunoassay for Mediterranean yellowtail (*Seriola dumerilii*, Risso 1810) LH. *Aquaculture* 2002; 210(1-4):203-218.
- Hernández-Rauda R, Otero J, Rey P, Rozas G, Aldegunde M. Dopamine and serotonin in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) pituitary: main metabolites and changes during gonadal recrudescence. *Gen Comp Endocrinol* 1996; 103:13-23.
- Hirai T, Oba Y, Yao ZX. (1999). Putative gonadotropin receptors in tilapia (*Oreochromis niloticus*) gonads: cDNA cloning and expression during oogenesis. In: Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO (Eds) *Proceedings of the Sixth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Institute of Marine Research and University of Bergen, pp 201.

Bibliografia

- Holland MCH, Hassin S, Zohar Y. Effects of long-term testosterone, gonadotropin-releasing hormone agonist, and pimozide treatments on gonadotropin II levels and ovarian development in juvenile female striped bass (*Morone saxatilis*). *Biol Reprod* 1998; 59: 1153-1162.
- Hotchkiss J, Knobil E. (1994) The menstrual cycle and its neuroendocrine control. In: Knobil E, Neil JD (Eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp 711-749.
- Huang CJ, Huang FL, Wang YC, Chang YS, Lo TB. Organization and nucleotide sequence of carp gonadotropin alpha subunit genes. *Biochem Biophys Acta* 1992; 1129:239-242.
- Huang YS, Schmitz M, Le Belle N, Chang CF, Quérat B, Dufour S. Androgens stimulate gonadotropin-II β subunit in eel pituitary cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 131:157-166.
- Huggard D, Khakoo Z, Kassam G, Mahmoud SS, Habibi HR. Effect of testosterone on maturational gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid levels in the goldfish pituitary. *Biol Reprod* 1996; 54:1184-1191.
- Hyllner SJ, Haux C. Vitelline envelope proteins in teleost fish. (1995). In: Goetz FW, Thomas P (Eds) *Proceedings of the Fifth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. University of Texas, Austin, pp 331-335.
- Isaacs NW. Cystine knots. *Curr Opin Struct Biol* 1995; 5:391-395.
- Iwakoshi E, Takuwa-Kuroda K, Fujisawa Y. Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291:1187-1193. *J. Fish. Aquat. Sci.* 39,65-79.
- Jackson K, Goldberg D, Ofir M, Abraham M, Degani G. Blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) gonadotropic beta subunits (I and II) cDNA sequences and expression during oogenesis. *J Mol Endocrinol* 1999; 23:177-87.
- Jakobsson S, Mayer I, Schulz RW, Blankenstein MA, Borg B. Specific binding of 11-ketotestosterone in an androgen target organ, the kidney of the male three-spined stickleback, *Gasterosteus Aculeatus*. *Fish Physiol Biochem* 1996; 15:459-467.

Bibliografía

- Kagawa H, Young G, Nagahama Y. Estradiol-17 β production in isolated amago salmon (*Onchorhynchus rhodurus*) ovarian follicles and its stimulation by gonadotropins. *Gen Comp Endocrinol* 1982; 47:361-365.
- Kah O, Chambolle P. Serotonin in the brain of the goldfish, *Carassius auratus*. An immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 1983; 234:319-333.
- Kah O, Pontet A, Núñez-Rodríguez J, Calas A, Breton B. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for goldfish gonadotropin. *Biol Reprod* 1989; 40:68-73.
- Kah O, Trudeau VL, Sloley BD, Chang JP, Dubourg P, Yu KL, Peter RE. Influence of GABA on gonadotropin release in the goldfish. *Neuroendocrinology* 1992; 55:396-404.
- Kah O, Anglade I, Leprêtre E, Dubourg P, Monbrison D. The reproductive brain in fish. *Fish Physiol Biochem* 1993; 11:1-6.
- Kah O, Zanuy S, Pradelles P, Cerdá J, Carrillo M. An enzyme immunoassay for salmon gonadotropin-releasing hormone and its application to the study of the effects of diet on brain and pituitary GnRH in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Gen Comp Endocrinol* 1994; 95:464-474.
- Kah O, Anglade I, Linard B, Pakdel F, Salbert G, Bailhache T, Ducouret B, Saligaut C, Le Goff P, Valotaire Y, Jégo P. Estrogen receptors in the brain-pituitary complex and the neuroendocrine regulation of gonadotropin release in rainbow trout. *Fish Physiol Biochem* 1997; 17:53-62.
- Kaiser UB, Sabbagh E, Katzenellenbogen RA, Conn PM, Chin WW. A mechanism for the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:12280-12284.
- Kajimura S, Yoshiura Y, Suzuki M, Aida K. cDNA cloning of two gonadotropin beta subunits (GTH-I beta and -II beta) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gen Comp Endocrinol* 2001; 122:117-129.

Bibliografía

- Kanamori A, Nagahama Y. Developmental changes in the properties of gonadotropin receptors in the ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) during oogenesis. *Gen Comp Endocrinol* 1988; 72:25-38.
- Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988;60:2299-301.
- Kato Y, Gen K, Maruyama O, Tomizawa K, Kato T. Molecular cloning of cDNAs encoding two gonadotropin beta subunits (GTH-I beta and -II beta) from the masu salmon, *Oncorhynchus masou*: rapid divergence of the GTH-I beta gene. *J Mol Endocrinol* 1993; 11:275-82.
- Kawauchi H, Suzuki K, Itoh H, Swanson P, Naito N, Nagahama Y, Nomki M, Nakai Y, Itoh S. The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiol Biochem* 1989; 7:29-38.
- Khakoo Z, Bhatia A, Gedamu L, Habibi HR. Functional specificity for salmon gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II coupled to the gonadotropin release and subunit messenger ribonucleic acid level in the goldfish pituitary. *Endocrinology* 1994; 134:838-847.
- Khan IA, Thomas P. Stimulatory effects of serotonin on maturational gonadotropin release in the Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*. *Gen Comp Endocrinol* 1992; 88:388-396.
- Kime DE, Manning NJ. Seasonal patterns of free and conjugated androgens in the brown trout, *Salmo trutta*. *Gen Comp Endocrinol* 1982; 48:222-231.
- Kime DE. "Classical" and "non-classical" reproductive steroids in fish. *Rev Fish Biol Fish* 1993; 3:160-180.
- King JA, Millar RP. Genealogy of the GnRH family. *Prog Clin Biol Res* 1990; 342:54-59.
- King JA, Millar RP. Evolution of gonadotropin-releasing hormones. *Trends Endocrinol Metab* 1992; 3:339-346.
- King W, Glosch S, Thomas P, Sullivan CV. (1995). Ovarian receptors for 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 β -S) in striped bass. In: Goetz FW, Thomas P (Eds)

Bibliografía

- Proceedings of the Fifth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. University of Texas, Austin, pp 314.
- Kitahara N, Nishizawa T, Gatanaga T, Okazaki H, Andoh T, Soma GI. Primary structure of two mRNAs encoding putative salmon α -subunits of pituitary glycoprotein hormone. *Comp Biochem Physiol* 1988; 91B:551-556.
- Kobayashi M, Aida K, Hanyu I. Radioimmunoassay for silver carp gonadotropin. *Bull Japan Soc Sci Fish* 1985; 51:1085-1091.
- a Kobayashi M, Aida K, Hanyu I. Hormone changes during ovulación and effects of steroid hormones on plasma gonadotropin levels and ovulación in goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 1987; 67:24-32.
- b Kobayashi M, Aida K, Sakai H, Haneko T, Ashashina K, Hanyu I, Ishii S. Radioimmunoassay for salmon gonadotropin. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1987; 53:995-1003.
- Kobayashi M, Aida K, Hanyu I. Induction of gonadotropin surge by steroid hormone implantation in ovariectomized and sexually regressed female goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 1989; 73:469-476.
- Kobayashi M, Stacey EN. Effects of avariectomy and steroid hormone implantation on serum gonadotropin levels in female goldfish. *Zool Sci* 1990; 7:715-721.
- Kobayashi M, Kato Y, Yoshiura Y, Aida K. Molecular cloning of cDNA encoding two types of pituitary gonadotropin alpha subunit from the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 1997; 105:372-378.
- Kohn LD, Shimura H, Shimura Y. The thyrotropin receptor. *Vitam Horm* 1995; 50:287-384.
- Koide Y, Noso T, Schouten G, Peute J, Zandbergen MA, Bogerd J, Schulz RW, Kawauchi H, Goos HJ. Maturational gonadotropin from the African catfish, *Clarias gariepinus*: purification, characterization, localization, and biological activity. *Gen Comp Endocrinol* 1992; 87:327-341.

- Koide, Y, Itoh, H, Kawauchi, H. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins, GTHI and GTHII, from bonito (*Katsuwonus plelami*) pituitary glands. *Int J Pept Protein Res* 1993; 41:52-65.
- a Kumar RS, Ijiri S, Trant JM. Molecular biology of the channel catfish gonadotropin receptors: 1. Cloning of a functional luteinizing hormone receptor and pre-ovulatory induction of gene expression. *Biol Reprod* 2001; 64:1010-1018.
- b Kumar RS, Ijiri S, Trant JM. 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.* 2001; 65:710-7.
- Laphorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, Morgan FJ, Isaacs NW. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 1994; 369:455-461.
- Larsen DA, Swanson P. Effects of gonadectomy on plasma gonadotropins I and II in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen Comp Endocrinol* 1997; 108:152-160.
- Le Dréan Y, Liu D, Wong AOL, Xiong F, Hew CL. Steroidogenic factor 1 and estradiol receptor act in synergism to regulate the expression of the salmon gonadotropin II β subunit gene. *Mol Endocrinol* 1996; 10:217-229.
- Le Gac F, Ollitrault M, Loir M, Le Bail PY. Evidence for binding and action of growth hormone in trout testis. *Biol Reprod.* 1992; 46:949-57.
- Le Gac F, Blaise O, Fostier A, Le Bail PY, Loir M, Mourot B, Weil C. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiol Biochem* 1993; 11:219-232.
- Lescheid DW, Powell DFF, Fischer WH. Mammalian gonadotropin-releasing hormone (GnRH) identified by primary structure in Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedti*. *Regul Peptides* 1995; 55:299-309.
- Li MD, Ford JJ. A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequences of the α - and β -subunits of glycoprotein hormone gene family. *J Endocrinol* 1998; 156:529-542.
- Licht P, Papkoff H, Farmer SW, Muller CH, Tsui HK, Crews D. Evolution of gonadotropin structure and function. *Recent Prog Hom Res* 1977; 33:169-248.

Bibliografía

- Lin HR, Zhou XJ, Van der Kraak G, Peter RE. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on gonadotropin secretion and ovulación in Chinese loach, *Paramisgurnus dabryanus*. *Aquaculture* 1991; 95:139-142.
- Lovejoy DA, Fischer WH, Ngamvongchon S. Distinct sequence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:6373-6377.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily - The second decade. *Cell* 1995; 83:835-839.
- a Mañanós EL, Swanson P, Stubblefield J, Zohar Y. Purification of gonadotropin II from a teleost fish, the hybrid striped bass, and development of a specific enzyme-linked immunosorbent assay. *Gen Comp Endocrinol* 1997; 108:209-222.
- b Mañanós EL, Zanuy S, Carrillo M. Photoperiodic manipulation of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development, and plasma 17 β -estradiol and vitellogenin levels. *Fish Physiol Biochem* 1997; 16:211-222.
- Mayer I, Lundqvist H, Berglund I, Schmitz M, Schulz R, Borg B. Seasonal endocrine changes in Baltic salmon, *Salmo salar*, immature parr and mature male parr. I. Plasma levels of five androgens, 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone and of 17 β -estradiol. *Canad J Zool* 1990; 68:1360-1365.
- Mayer I, Schmitz M, Borg B, Schulz R. Seasonal endocrine changes in male and female Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). I. Plasma levels of three androgens 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone, and 17 β -estradiol. *Canad J Zool* 1992; 70:37-42.
- Mayer I, Rand-Weaver M, Borg B. Effects of gonadectomy and steroids on plasma and pituitary levels of somatotactin in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Gen Comp Endocrinol*. 1998; 109:223-31.
- Melamed P, Rosenfeld H, Elizur A, Yaron Z. Endocrine Regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comp Biochem Physiol C* 1998; 119:325-338.

Bibliografía

- Melamed P, Gur G, Rosenfeld H, Elizur A, Schulz RW, Yaron Z. Reproductive development of male and female tilapia hybrids (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) and changes in mRNA levels of gonadotropin (GtH) I beta and II beta subunits. *J Exp Zool* 2000; 286:64-75.
- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y. Hormonal induction of all stages of spermatogénesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc Nat Acad Sci USA* 1991; 88:5774-5778.
- Miwa S, Yan L, Swanson P. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by in vitro ligand autoradiography. *Biol Reprod* 1994; 50:629-642.
- Mizutani T, Minegishi T, Nonobe Y. Molecular cloning and functional expression of chicken luteinizing hormone receptor. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1397:1-8.
- Montaner AD, Park M, Fischer WH. Primary structure of a novel gonadotropin-releasing hormone in the brain of a teleost, pejerrey. *Endocrinology* 2001; 142:1453-1460.
- Montero M, Dufour S. Gonadotropin-releasing hormones (GnRH) in fishes - evolutionary data on their structure, localization, regulation, and function. *Zoological Studies* 1996; 35:149-160.
- Montero M, Le Belle N, King JA, Millar RP, Dufour S. Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European silver eel (*Anguilla anguilla*). *Endocrinology* 1996; 134:838-847.
- Mylonas CC, Richardson BM, Minkinnen SP, Zohar Y. Induced spawning of American shad (*Alosa sapidissima*) using sustained administration of gonadotropin-releasing hormone analog (GnRH). *J World Aquacult Soc* 1995; 26:39-50.
- Nagahama Y. (1983). The functional morphology of the teleost gonads. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Eds) *Fish Physiology*. Academic Press, New York, Vol. IXA, pp 223-275.
- Nagahama Y. Gonadotropin action on gametogénesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zool Sci* 1987; 4:209-222.
- Nagahama Y, Yoshikuni M, Yamashita. Molecular endocrinology of oocyte growth and maturation in fish. *Fish Physiol Biochem* 1993; 11:3-14.

- Naito N, Hyodo S, Okumoto N, Urano A, Nakai Y. Differential production and regulation of gonadotropins (GTH I and GTH II) in the pituitary gland of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during ovarian development. *Cell Tissue Res* 1991; 266:457-467.
- Naito N, Suzuki K, Swanson P, Nozaki M, Kawauchi H, Nakai Y. Ultrastructural characteristics of two distinct gonadotropas (GtH-I and GtH-II) in the pituitary of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol. Biochem.* 1993; 11:241-246.
- Naor Z, Harris D, Shacham S. Mechanism of GnRH receptor signaling: combinatorial cross-talk of Ca²⁺ and protein kinase C. *Neuroendocrinol* 1998; 19:1-19.
- Navas JM, Anglade I, Bailhache T, Pakdel F, Breton B, Jegou P, Kah O. Do gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptors in the rainbow trout? a double immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 1995; 363:461-474.
- Navas JM, Mañanós EL, Thrush M, Ramos J, Zanuy S, Carrillo M, Zohar Y, Bromage NR. Effect of dietary lipid composition on vitellogenin, 17 beta-estradiol and gonadotropin plasma levels and spawning performance in captive sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). *Aquaculture* 1998; 165:65-79.
- Ngamvongchon S, Lovejoy DA, Fischer WH. Primary structures of two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Mol Cell Neurosci* 1992; 3:17-22.
- a Nozaki M, Naito N, Swanson P, Dickhoff WW, Nakai Y, Suzuki K, Kawauchi H. Salmonids pituitary gonadotropas. II. Ontogeny of GTH I and GTH II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). *Gen Comp Endocrinol* 1990; 77:358-367.
- b Nozaki M, Naito N, Swanson P, Miyata K, Nakai Y, Oota Y, Suzuki K, Kawauchi H. Salmonids pituitary gonadotropas. I. Distinct cellular distributions of two gonadotropins, GTH I and GTH II. *Gen Comp Endocrinol* 1990; 77:348-357.
- Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, Nagahama Y. Fish pituitary glycoprotein hormone receptors: cloning and characterization of two different gonadotropin receptors from the gonads and two thyrotropin-like receptors from thyroid of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). In: Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E,

Bibliografía

- Stefansson SO (Eds) Proceedings of the Sixth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Institute of Marine Research and University of Bergen, pp 164-166.
- Okada T, Kawazoe I, Kimura S, Sasamoto Y, Aida K, Kawauchi H. Purification and characterization of gonadotropin I and II from pituitary glands of tuna (*Thunnus obesus*). *Int J Peptide Protein Res* 1994; 43:69-80.
- Okubo K, Suetake H, Aida K. Expression of two gonadotropin-releasing hormone (GnRH) precursor genes in various tissues of the Japanese eel and evolution of GnRH. *Zool Sci* 1999; 16:471-478.
- Okuzawa K, Amano M, Kobayashi M, Aida K, Hanyu I, Hasegawa Y, Miyamoto K. Differences in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in discrete brain areas of male and female rainbow trout according to age and stage of maturity. *Gen Comp Endocrinol* 1990; 80:116-126.
- Okuzawa K, Granneman J, Bogerd J. Distinct expression of GnRH genes in the red seabream brain. *Fish Physiol Biochem* 1997; 17:71-79.
- Olivereau M, Chambolle P. Ultrastructure of gonadotropic cells of the normal eel and after estradiol injection. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1978; 287:1409-1412.
- Pankhurst NW, Stacey NE. The effect of 17 β -estradiol on spontaneous ovulación in the goldfish, *Canad J Zool* 1985; 63:2979-2981.
- Parhar IS, Soga T, Ishikawa Y, Nagahama Y, Sakuma Y. Neurons synthesizing gonadotropin-releasing hormone mRNA subtypes have multiple developmental origins in the medaka. *J Comp Neurol* 1998; 401:217-226.
- Pasmanik M, Callard GV. Aromatase and 5 alpha-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol* 1985; 60:244-251.
- Pasmanik M, Callard GV. A high abundance androgen receptor in goldfish brain: characteristics and seasonal changes. *Endocrinology* 1988; 123:1162-1171.

Bibliografia

- Patino R, Thomas P. 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* 1990; 78:204-217.
- Peng C, Trudeau VL, Peter RE. Seasonal variation of neuropeptide Y actions on growth hormone and gonadotropin-II secretion in the goldfish: effects of sex steroids. *J Neuroendocrinol* 1993; 5:273-280.
- Peter RE, Trudeau VL, Sloley BD, Peng C, Nahorniak CS. (1991). Actions of catecholamines, peptides and sex steroids in regulation of gonadotropin-II in the goldfish. In: Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS (Eds) *Proceedings of the Fourth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Sheffield, pp 30-34.
- Pickett GD, Graham D, Pawson MG, Michael G. 1994. *Sea Bass-Biology, Exploitation, and Conservation*. Chapman & Hall, London.
- Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 1981; 50:465-495.
- Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, Solar II, Devlin RH, Donaldson EM. Brief Treatment with an Aromatase Inhibitor During Sex Differentiation Causes Chromosomally Female Salmon to Develop as Normal, Functional Males. *J Exp Zool* 1994; 270: 255-262.
- a Powell JFF, Reska-Skinner SM, Prakash OM. Two new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:10461-10464.
- b Powell, JFF, Zohar Y, Elizur A, Park C, Fisher WH, Craig AG, Rivier JE, Lovejoy DA, Sherwood NM. Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brain of one species. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:12081-12085.
- Powell JFF, Fischer WH, Park M. Primary structure of a solitary form of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in cichlid pituitary; three forms of GnRH in brain of cichlid and pumpkinseed fish. *Regul Peptides* 1995; 57:43-53.

Bibliografia

- Powell JFF, Strandén EM, Carolsfeld J. Primary forms of 3 forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the pacu brain. *Regul Peptides* 1997; 68:189-195.
- Prat F, Zanuy S, Carrillo M, de Mones A, Fostier A. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Gen Comp Endocrinol* 1990; 78: 361-373.
- Prat F, Sumpter JP, Tyler CR. 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* 1996; 54: 1375-1382.
- Quérat B, Moumni M, Jutisz M, Fontaine YA, Counis R. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for the putative beta subunit of the type-II gonadotrophin from the European eel. *J Mol Endocrinol* 1990; 4(3):257-264.
- Quérat B, Hardy A, Fontaine YA. Regulation of the type-II gonadotropin α and β subunit mRNAs by oestradiol and testosterone in the European eel. *J Mol Endocrinol* 1991; 7:81-86.
- Quérat B. Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates. In: Davey KG, Peter RE, Tobe SS (eds.), *Perspectives in Comparative Endocrinology*. Ottawa: National Research Council of Canada; 1994:27-35.
- Quérat, B. (1995). Structural relationships between "Fish" and Tetrapod gonadotropins. In: Goetz FW, Thomas P (Eds) *Proceedings of the Fifth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. University of Texas, Austin, pp 7-9.
- Quérat B, Sellouk A, Salmon C. Filogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) β subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. *Biol Reprod* 2000; 63:222-228.
- Quérat B, Tonnerre-Doncarli C, Genies F, Salmon C. Duality of gonadotropins in gnathostomes. *Gen Comp Endocrinol* 2001; 4:308-14.



Bibliografía

- Rand-Weaver M, Noso T, Muramoto K, Kawauchi H. Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. *Biochemistry*. 1991; 30:1509-15.
- Rand-Weaver M, Swanson P, Kawauchi H, Dickhoff WW. Somatolactin, a novel pituitary protein: purification and plasma levels during reproductive maturation of coho salmon. *J Endocrinol*. 1992; 133:393-403.
- Rand-Weaver M, Swanson P. Plasma somatolactin levels in coho salmon, (*Oncorhynchus kisutch*) during smoltification and sexual maturation. *Fish Physiol Biochem* 1993; 11:175-182.
- Rosenblum PM, Yamada L, Callard IP, Callard GV. Validation of radioimmunoassay systems for the measurement of 11-keto and 11 β -hydroxytestosterone in teleost blood. *Comp Biochem Physiol* 1985; 82:659-665.
- Rosenfeld H, Levavi-Sivan B, Gur G, Melamed P, Meiri I, Yaron Z, Elizur A. Characterization of tilapia FSH β gene and analysis of its 5' flanking region. *Comp Biochem Physiol* 2001; 129B:389-398.
- Sakai N, Ueda H, Suzuki N, Nagahama Y. Steroid production by amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) testes at different developmental stages. *Gen Comp Endocrinol* 1989; 75:231-240.
- Salbert G, Bailhache T, Zohar Y, Breton B, Jégo P. A rapid and sensitive ELISA for rainbow trout maturational gonadotropins (tGTH II): validation on biological samples; in vivo and in vitro responses to GnRH. *Gen Comp Endocrinol* 1990; 78:110-122.
- Saligaut C, Granier DH, Bennani S, Salbert G, Bailhache T, Jégo P. Effects of estradiol on brain aminergic turnover of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at the beginning of the vitellogenesis. *Gen Comp Endocrinol* 1992; 88:209-216.
- Saligaut C, Linard B, Mañanós EL, Kah O, Breton B, Govoroun M. Release of pituitary gonadotropins GtH I and GtH II in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): modulation by estradiol and catecholamines. *Gen Comp Endocrinol* 1998; 109:302-309.

Bibliografia

- Santos EM, Rand-Weaver M, Charles RT. Follicle-Stimulating Hormone and its α and β subunits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): purification, characterization, development of specific radioimmunoassays, and their seasonal plasma and pituitary concentrations in females. *Biol Reprod* 2001; 65:288-294.
- Scott AP, Bye VJ, Baynes SM. Seasonal variation in sex steroids of female rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Fish Biol* 1980; 17:587-592.
- Scott AP, Sumpter JP. Seasonal variations in testicular germ cells stages and in plasma concentrations of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*) maturing at two years old. *Gen Comp Endocrinol* 1989; 73:46-58.
- Schreibman MP. Studies on the pituitary gland of *Xiphophorus maculatus* (the platyfish). *Zoologica* 1964; 49:217-244.
- Schreibman MP, Margolis-Nunno H, Halpern-Sebold LR, Goos HJTh, Perlman PW. The influence of androgen administration on the structure and function of the brain-pituitary-gonad axis of sexually immature platyfish, *Xiphophorous maculatus*. *Cell Tissue Res* 1986; 245:519-524.
- Schulz RW, Bosma PT, Zandbergen MA, Van der Sanden MC, Van Dijk W, Peute J, Bogerd J, Goos HJ. Two gonadotropin-releasing hormones in the African catfish, *Clarias gariepinus*: localization, pituitary receptor binding, and gonadotropin release activity. *Endocrinology* 1993; 133:1569-1577.
- Schulz RW, Vischer HF, Cavaco JE, Santos EM, Tyler CR, Goos HJ, Bogerd J. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comp Biochem Physiol* 2001; 129B:407-417.
- Sealfon SC, Weinstein H, Millar RP. Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev* 1997; 18:180-205.
- Sekine S, Saito A, Itoh H, Kawauchi H, Itoh S. Molecular cloning and sequence analysis of chum salmon gonadotropin cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:8645-8649.
- Senthilkumaran B, Okuzawa K, Gen K, Ookura T, Kagawa H. Distribution and seasonal variations in levels of three native GnRHs in the brain and pituitary of perciform fish. *J Neuroendocrinol* 1999; 11:181-186.

Bibliografia

- Shacham S, Harris D, Ben-Shlomo H, Cohen I, Bonfil D, Przedeki F, Lewy H, Ashkenazi IE, Seger R, Naor Z. Mechanism of GnRH receptor signaling on gonadotropin release and gene expression in pituitary gonadotropas. *Vitam Horm.* 2001;63:63-90.
- Sherwood NM, Eiden L, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:2794-2798.
- Sherwood NM, Sower SA, Marshak DR, Fraser BA, Brownstein MJ. Primary structure of gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *J BiolChem* 1986; 261:4812-4819.
- Shupnik MA, Rosenzweig, BA. Identification of an estrogen-responsive element in the rat LH β gene. *J Biol Chem* 1991; 266:17084-17091.
- a Shupnik MA. Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. *Biol Reprod* 1996; 54:279-286.
- b Shupnik MA. Gonadal hormone feedback on pituitary gonadotropin genes. *TEM* 1996; 7:272-276.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 1997; 18:739-773.
- Slater CH, Schreck CB, Swanson P. Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp Biochem Physiol* 1994; 109A:167-175.
- a Sohn YC, Suetake H, Yoshiura Y, Kobayashi M, Aida K. Structural and expression analyses of gonadotropin I β subunits genes in goldfish (*Carassius auratus*). *Gene* 1998; 222:257-267.
- b Sohn YC, Yoshiura Y, Kobayashi M, Aida K. Effect of sex steroids on the mRNA levels of gonadotropin I and II subunits in the goldfish *Carassius auratus*. *Fisheries Science* 1998; 64:715-721.

Bibliografía

- Sohn YC, Yoshiura Y, Kobayashi M, Aida K. Seasonal changes in mRNA levels of gonadotropin and thyrotropin subunits in the goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol. 1999; 113:436-444.
- Somoza GM, Peter RE. Effects of serotonin on gonadotropin and growth hormone release from in vitro perfused goldfish pituitary fragments. Gen Comp Endocrinol 1991; 82:103-110.
- Sorbera L, Zanuy S, Carrillo M. (1997). Gonadotropin-releasing hormone action sea bass (*Dicentrarchus labrax*) pituitary primary cell cultures. In: Proceedings of the Third International Symposium on Research for Aquaculture: Fundamental and Applied Aspects. Univ. Barcelona.
- Sower SA, Chiang YC, Lovas S, Conlon M. Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. Endocrinology 1993; 132:1125-1131.
- Stuart-Kregor PA, Sumpter JP, dodd JM. The involvement of gonadotropin and sex steroids in the control of reproduction in the parr and adults of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. J. Fish Biol. 1981; 18:59-72.
- Sumpter JP, Tyler CR, Kawauchi H. (1991). Actions of GTH I and GTH II on ovarian steroidogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Scott AP, Sumpter JP, Kime DM, Rolfe MS (Eds) Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish.. University of East Anglia, Norwich, pp 27.
- Sun PD, Davies DR. The cystine-knots growth-factor superfamily. Annu Rev Biophys Biomol Struct 1995; 24:269-291.
- Sundararaj BI, Goswami SV. Some aspects of induced spawning in the hypophysectomized catfish, *Heteropneustes fossilis*. Bull Nat Inst Sci India 1968; 36:189-193.
- a Suzuki K, Kawauchi H, Nagahama Y. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. Gen. Comp. Endocrinol. 1988; 71:292-301.

Bibliografia

- b Suzuki K, Kawauchi H, Nagahama Y. Isolation and Characterization of subunita from two distinct Salmon Gonadotropins. *Gen Comp Endocrinol* 1988; 71:302-306.
- Suzuki K, Liu D, Hew CL. A gene encoding chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) gonadotropin alpha subunit: gene structure and promoter analysis in primary pituitary cells. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1995; 4:10-9.
- Swanson P, Dickhoff WW. Effects of exogenous gonadal steroids on gonadotropins I and II in juvenile coho salmon. *Amer Zool* 1988; 28: 55A.
- Swanson P, Suzuki K, Kawauchi H, Dickhoff WW. Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biol Reprod* 1991; 44:29-38.
- Swanson P. (1991). Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. In: Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS (Eds) *Proceedings of the Fourth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. Sheffield, pp 1-7.
- Swanson P, Dickey JT. (1996). Regulation of gonadotropin I by sex steroids and gonadotropin-releasing hormone in coho salmon. In: *Third International Symposium on Fish Endocrinology*. Hakodate, Japan, pp 65.
- Swanson P, Dittman A. (1997). Pituitary gonadotropins and their receptors in fish. In: Kawashima S, Kikuyama S (Eds) *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Advances in Comparative Endocrinology*. Monduzzi Editore, Bologna, pp 841-846.
- Szkudlinski MW, Thotakura NR, Tropea JE, Grossmann M, Weintraub BD. Asparagine-linked oligosaccharide structures determine clearance and organ distribution of pituitary and recombinant thyrotropin. *Endocrinology* 1995; 136:3325-3330.
- Takada K, Kubokawa K, Ishii I. Specific binding sites in the bullfrog testis. *Gen Comp Endocrinol* 1986; 61:202-312.
- Tanaka H, Kagawa H, Okazawa K, Hirose K Purification of gonadotropins (PmGTH I and II) from red seabream (*Pagrus major*) and development of a homologous radioimmunoassay for PmGTH II. *Fish Physiol Biochem* 1993; 10:409-418.
- Tatsumi K, Hayashizaki Y, Hiraoka Y, Miyai K, Matsubara K. The structure of the human thyrotropin beta-subunit gene. *Gene* 1988; 73:489-497.

Bibliografía

- Timmers RJ, Lambert JG, Peute J, Vullings HG, Van Oordt PG. Localization of aromatase in the brain of the male African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by microdissection and biochemical identification. *J Comp Neurol* 1987; 258:368-377.
- Trinh K-Y, Wang NC, Hew C, Crim LW. Molecular cloning and sequencing of salmon gonadotropin β subunit. *Eur J Biochem* 1986; 159:619-624.
- Trudeau VL, Peter RE, Sloley BD. Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish. *Biol Reprod* 1991; 44: 951-960.
- Trudeau VL, Murthy CK, Habibi HR, Sloley BD, Peter RE. Effects of sex steroid treatments on gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin secretion from the goldfish pituitary. *Biol Reprod* 1993; 48:300-307.
- Trudeau VL, Peter RE (1995). Functional interactions between neuroendocrine systems regulating GTH-II release. In: Goetz FW, Thomas P (Eds) *Proceedings of the Fifth International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. University of Texas, Austin, pp 44-47.
- Trudeau VL. Neuroendocrine regulation of gonadotropin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev Reprod* 1997; 2:55-68.
- Ueda H, Kambegawa A, Nagahama Y. Involvement of gonadotropin and steroid hormones in spermiación the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, and goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 1985; 59:24-30.
- Ulloa-Aguirre A, Midgley Jr AR, Beitins IZ, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: characterization and physiological relevance. *Endocr Rev* 1995; 16:765-787.
- Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum Reprod Update* 1998; 4:260-283.
- Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damian-Matsumura P, Dias JA. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 1999; 11:205-215.

Bibliografia

- Van den Hurk, R, 1982. Effects of steroids on gonadotropic (GTH) cells in the pituitary of rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, shortly after hatching. *Cell Tissue Res.* 224, 361-368.
- Van Der Kraak G, Suzuki K, Peter E, Itoh H, Kawauchi H. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *Gen Comp Endocrinol* 1992; 85:217-229.
- Van Oordt PGWJ, Peute J. (1983). The cellular origin of pituitary gonadotropins in teleost. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Eds) *Fish Physiology*. Academic Press, New York, Vol. 9A:137-186.
- Van Putten LJ, Peute J, Van Oordt PG, Goos HJ, Breton B. Glycoprotein gonadotropin in the plasma and its cellular origin in the adenohypophysis of sham-operated and ovariectomized rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res* 1981; 218:439-448.
- Van Zuylen CW, Kamerling JP, Vliegthart JF. Glycosylation beyond the Asn78-linked GlcNAc residue has a significant enhancing effect on the stability of the α subunit of human chorionic gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 232:117-120.
- Veldhuis J. (1991). The hypothalamic-pituitary-testicular axis. In: Yen SC, Jaffe RB (Eds) *Reproductive Endocrinology*. WB Saunders Company.
- Weil C, Bougoussa-Houadec M, Gallais C, Itoh S, Sekine S, Valotaire Y. Preliminary evidence suggesting variations of GtH 1 and GtH 2 mRNA levels at different stages of gonadal development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* 1995; 100:327-333.
- Weltzien FA, Andersson E, Andersen Ø, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B. The brain-pituitary-gonad axis in male teleost, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiforms). *Comp Biochem Physiol* 2004; 137A:447-477.
- Wheeler, Alwyne. (1975). *Fishes of the World*. Macmillan Publishing Co., New York.
- White SA, Kasten TL, Bond CT, Adelman JT, Fernald RD. Genomic structure and expression sites of three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. *Neurobiology* 1995; 92:8363-8367.

Bibliografia

- Wu H, Lustbader JW, Liu Y, Canfield RE, Hendrickson WA. Structure of human chorionic gonadotropin at 2,6Å resolution from MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Structure* 1994; 2:545-558.
- Xia H, Chen F, Puett D. A region in the human glycoprotein hormone α -subunit important in holoprotein formation and receptor binding. *Endocrinology* 1994; 134:1768-1770.
- Xiong F, Hew CL. Chinook salmon gonadotropin II β -subunit gene encodes multiple messenger ribonucleic acids. *Can. J. Zool.* 1991; 69:2572-2578.
- a Xiong F, Liu D, Elsholtz HP, Hew CL. The chinook salmon gonadotropin II beta subunit gene contains a strong minimal promoter with a proximal negative element. *Mol Endocrinol* 1994; 8:771-781.
- b Xiong F, Liu D, Le Dréan Y, Elsholtz HP, Hew CL. Differential recruitment of steroid hormone response elements may dictate the expression of the pituitary gonadotropin II β subunit gene during salmon maturation. *Mol Endocrinol* 1994; 8:782-93.
- c Xiong F, Suzuki K, Hew CL. (1994). Control of teleost gonadotropin gene expression. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Eds) *Fish Physiology*. Academic Press, New York, Vol. XIII, pp 135-158.
- Yamamoto, T. (1969). Sex differentiation. In: Hoar WS, Randall DJ (Eds) *Physiology*. Academic Press, New York, pp 117-175.
- Yan I, Swanson P, Dickhoff WW. A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). *Biol Reprod* 1992; 47:418-427.
- Yen SC, Jaffe RB. (1991). *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management*. Edited by WB Saunders Company.
- Yoo MS, Kank HM, Choi HS. Molecular cloning, distribution and pharmacological characterization of a novel gonadotropin-releasing hormone ([Trp⁸] GnRH) in frog brain. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 164:197-204.
- Yoshiura Y, Kobayashi M, Kato Y, Aida K. Molecular cloning of the cDNAs encoding two gonadotropin β subunits (GTH I β and GTH II β) from the goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 1997; 105:379-389.

Bibliografía

- Yoshiura Y, Suetake H, Aida K. Duality of gonadotropin in a primitive teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Gen Comp Endocrinol* 1999; 114:121-131.
- You S, Bridgham JT, Foster DN, Johnson AL. Characterization of the chicken follicle-stimulating hormone receptor (cFSH-R) complementary deoxyribonucleic acid, and expression of cFSH-R messenger ribonucleic acid in the ovary. *Biol Reprod* 1996; 55:1055-1062.
- Yu K, Sherwood N, Peter R. Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of the goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides* 1988; 9:625-630.
- Yu KL, Peng C, Peter RE. Changes in brain levels of gonadotropin-releasing hormone and serum levels of gonadotropin and growth hormone in goldfish during spawning. *Can J Zool* 1991; 69:182-188.
- Zhang L, Wayne NL, Sherwood NM, Postigo HR, Tsai PS. Biological and immunological characterization of multiple GnRH in an opisthobranch mollusk, *Aplysia californica*. *Gen Comp Endocrinol* 2000; 117:77-89.
- Zmora N, González Martínez D, Muñoz Cueto JA, Madigou T, Mañanós E, Zanuy S, Zohar Y, Kah O, Elizur A. The GnRH system in the Europea sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Endocrinol* 2002; 172:105-116.
- Zohar Y, Breton B, Sambroni E, Fostier E, Tosky G, Pagelson G, Leibovitz D. Development of a homologous radioimmunoassay for a gonadotropin of the gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 1990; 88:189-204.
- Zohar Y, Elizur A, Sherwood NM, Powell JF, Rivier JE, Zmora N. Gonadotropin-releasing activities of the three native forms of gonadotropin-releasing hormone present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen Comp Endocrinol* 1995; 97:289-299.
- Zohar Y. New approaches for the manipulation of ovulación and spawning in farmed fish. *Bull Natl Res Inst Aquacult* 1996; 2:43-48.

-slab
bus
1000

1000

1000

1000

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha
acordó otorgar a esta Tesis Doctoral de

D./D^a **JORGE MATEOS PÉREZ**

la calificación de *Excellent cum Laude*

Valencia, a ...29... deabril..... de ...2005.....

EL/LA SECRETARIO/A,

Dr. D. José Francisco Pertusa Grau

EL/LA PRESIDENTE/A

Dr. D. Silvia Zanuy Doste

