



Efecto de los esteroides sobre la dinámica de las células germinales testiculares de pez cebra

Autor: Nuria Esther Gómez González

Institución: Universidad de Murcia

Otros autores: Alfonsa García Ayala (Universidad de Murcia); Rafael Henrique Nóbrega (Universidad de Utrecht, Universidad del Estado de São Paulo); Rüdiger W. Schulz (Universidad de Utrecht); Jan Bogerd (Universidad de Utrecht)

Resumen

Los peces, que representan una importante fuente mundial de alimentación, están sufriendo el incremento de amenazas a causa de la intensificación de la pesca y de los contaminantes medioambientales, algunos de los cuales actúan como disruptores endocrinos (DEs). La mayor parte de estos DEs se comportan como estrógenos, es decir, interfieren con la hormona femenina 17 β -estradiol (E2), actuando, en la mayor parte de los casos, por unión con los receptores de estrógenos (REs) (Tyler y col., 1998; Filby y Tyler, 2007) y en menor proporción como andrógenos. En peces, la espermatogénesis está regulada por las hormonas sexuales esteroideas, estrógenos y andrógenos.

El objetivo de nuestro estudio es determinar el efecto de las hormonas esteroideas sexuales en la espermatogénesis en peces para lo que hemos utilizado el pez cebra (*Danio rerio*, Hamilton 1882), considerado como modelo de estudio, para, posteriormente, comprobar los posibles efectos de los contaminantes ambientales de carácter estrogénico o androgénico sobre la capacidad reproductiva. En el presente trabajo hemos utilizado 3 lotes de peces cebra macho sexualmente maduros: 1) ejemplares control, 2) ejemplares expuestos a 10 nM de 17 β -estradiol (E2) en el agua del baño durante 5 semanas y 3) ejemplares expuestos a 10 nM de E2 en el agua del baño durante 3 semanas y, posteriormente, expuestos a 10 nM de E2 y 100 nM de ketoandrostenediona (OA) en el agua del baño durante las últimas dos semanas. Los resultados obtenidos indican que el E2 provoca una disminución del índice gonadosomático (IGS) e inhibe la progresión de la espermatogénesis mientras que los andrógenos aumentan el IGS y el número y porcentaje de los diferentes tipos celulares germinales, con la excepción de las espermatogonias A indiferenciadas, al tiempo que aumentan el nivel de expresión de genes marcadores específicos de espermatocitos, espermatidas y espermatozoides y de células de Leydig.

Palabras claves: Esteroides Andrógenos IGS espermatogonia pez cebra

INTRODUCCIÓN

La espermatogénesis es el proceso por el cual un pequeño número de células diploides, las células madre de las espermatogonias, producen un número elevado de células haploides especializadas, los espermatozoides. En peces, las hormonas hipofisarias, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), estimulan la producción de hormonas esteroideas sexuales en el testículo. En el seno de los órganos reproductores masculinos, el desarrollo de la espermatogénesis es regulado por diferentes hormonas que se unen a sus respectivos receptores y por factores de crecimiento. Los andrógenos pueden inducir la espermatogénesis completa en los peces teleósteos inmaduros o prepuberales mientras que su papel en la espermatogénesis en los teleósteos adultos es más desconocido. En los últimos años se ha demostrado que los estrógenos también desempeñan funciones importantes en algunas etapas de la espermatogénesis. Así sabemos que la exposición a estrógenos de individuos macho adultos de pez cebra provoca una inhibición de la producción de andrógenos (de Waal, 2009) lo que supone una acumulación de células germinales o espermatogonias inmaduras y una disminución del número de células germinales diferenciadas (desde espermatogonias tipo B hasta espermátidas) (de Waal, 2009).

La información existente sobre aspectos morfológicos o estereológicos del testículo de pez cebra, *Danio rerio*, Hamilton 1822, es muy escasa y está básicamente centrada en los efectos que producen ciertos factores endocrinos sobre la fisiología testicular. Recientemente se ha comprobado la importancia que tienen determinadas hormonas esteroideas, andrógenos y estrógenos, en el proceso de proliferación celular de las células madre de las espermatogonias y en su diferenciación.

El grupo de Biología Reproductiva de la División de Biología del Desarrollo del

Departamento de Biología de la Universidad de Utrecht (Holanda) hace años que trabaja en el campo de la Endocrinología y de la Reproducción en Peces. En los últimos años han iniciado una línea de investigación, que aúna estos dos campos de conocimiento, con la intención de conocer las interacciones existentes entre estos dos sistemas tanto a nivel hormonal como celular. Este estudio, ubicado en este marco de conocimiento, se centra en el efecto de estrógenos y andrógenos en la espermatogénesis de pez cebra, y más concretamente en las etapas de diferenciación de las células madre de las espermatogonias. Para ello, ejemplares macho adultos de pez cebra han sido tratados con el estrógeno, 17 β -estradiol (E₂), y con el andrógeno, 11-ketoandrostenediona (OA), y se ha analizado su efecto sobre el índice gonadosomático (IGS), el estado de desarrollo de los quistes de los túbulos seminíferos así como la ratio de renovación de las espermatogonias indiferenciadas y sobre la expresión de algunos genes marcadores de diferentes tipos celulares testiculares. Los resultados de este trabajo han sido procesados, analizados y discutidos, desde su inicio, bajo la supervisión del Departamento de Biología Celular e Histología de la Universidad de Murcia.

Teniendo en cuenta que el pez cebra está siendo utilizado como modelo en estudios sobre el desarrollo de vertebrados y en el análisis del efecto de contaminantes ambientales sobre la reproducción, nuestro estudio tiene gran interés científico tanto desde un punto de vista básico como aplicado en la industria de la acuicultura y en el de la toxicología ambiental.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los peces constituyen el grupo más extenso de vertebrados actuales que está compuesto por unas 24.600 especies de las cuales 23.700 son teleósteos. Esta gran diversidad se manifiesta en diferentes aspectos de la biología de este grupo como son su forma de vida, su fisiología y su reproducción. En el ámbito de la reproducción destaca la gran variedad de estrategias reproductivas que presentan. Así hay especies que desarrollan un único sexo funcional a lo largo de su vida, las gonocoristas, y especies que presentan ambos sexos funcionales a lo largo de su vida, las hermafroditas. A pesar de esta enorme diversidad reproductiva, las estructuras fundamentales que constituyen la gónada de los teleósteos son muy similares. Así, podemos referirnos de forma general a la morfología de las células germinales y de varios elementos somáticos que constituyen el tejido gonadal. Por otra parte, las diferentes etapas del ciclo gonadal, testicular y ovárico, son semejantes en todos los grupos de teleósteos con el mismo tipo de ciclo reproductor (Nagahama, 1983; Pudney, 1993; Callard y Callard, 1999). Nuestro conocimiento sobre la espermatogénesis en peces es, sin embargo, todavía muy limitado y ha estado centrado, principalmente, en diferentes especies con interés económico (salmón, trucha, dorada, anguila, etc.) las cuales varían dependiendo de los países y/o las diferentes regiones y del hábitat (marinos o dulceacuícolas).

En los últimos años el estudio de la espermatogénesis se está realizando, también, en especies modelo de investigación como el pez cebra. Esta especie ofrece una serie de ventajas para investigación entre las que destacan i) su pequeño tamaño que permite tener un gran número de ejemplares en un pequeño espacio, ii) su ciclo de vida rápido ya que son sexualmente maduros a los tres me-

ses de edad y se pueden reproducir de forma continua, iii) la transparencia en los estadios larvarios que permite la observación de fenómenos en vivo y en directo utilizando proteínas fluorescentes o colorantes vitales, iv) la alta tasa de fecundidad ya que cada hembra puede depositar unos 200 embriones/semana y v) que el desarrollo de los embriones es ex-útero. Todas estas características hacen posible realizar experimentos a gran escala. Otra ventaja del pez cebra reside en la posibilidad de crear líneas transgénicas que expresen proteínas fluorescentes en distintas células, con el fin de estudiar la movilización celular in vivo. Gracias a la secuenciación de su genoma se han podido conocer una gran cantidad de genes implicados en reproducción y en otros muchos procesos biológicos por lo que se ha convertido en una especie modelo de estudio en inmunidad, desarrollo, hematopoyesis, cáncer y toxicología, entre otros aspectos biológicos.

Los estudios realizados sobre reproducción y desarrollo permitirán conocer, en detalle, los principios generales que rigen la espermatogénesis así como los mecanismos que la regulan en condiciones fisiológicas y en condiciones ambientales desfavorables.

Testículo de teleósteos

El testículo de teleósteos es un órgano par, alargado que está unido a la parte dorsal de la pared del cuerpo por el mesorquio y que esta revestido por una capa de tejido conectivo, la túnica albugínea. El testículo conecta con el exterior mediante un conducto deferente que se origina en su región dorsal y que abre al exterior en la papila urogenital.

Estructura del testículo

Se han descrito dos tipos de estructura testicular: i) tubular o de distribución restringida y ii) lobular o de distribución no restringida, en función de dónde y cómo se desarrollen las células germinales (Grier, 1981; Billard y col., 1982) (Figura 1).

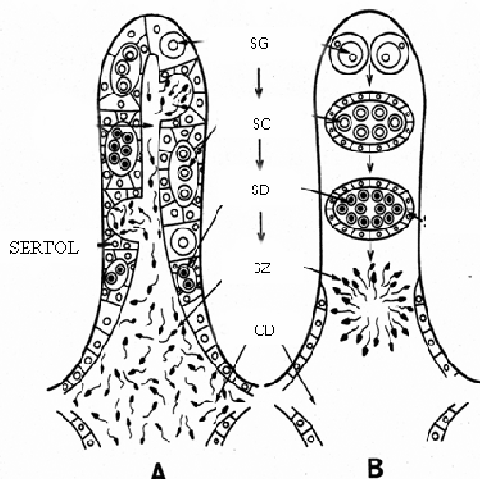


Figura 1. Tipos de estructuras testiculares. A: tipo lobular. B: tipo tubular. Espermatogonias (SG), espermátidas (SC), espermátidas (SD), espermatozoides (SZ), conducto deferente (CD) (Modificado de Nagahama, 1983).

El testículo de tipo lobular o de distribución no restringida presenta espermatogonias repartidas a lo largo de todo el tejido germinal dentro de los testículos. Los quistes no se desplazan durante su desarrollo. Esta distribución de espermatogonias es considerada como un modelo primitivo.

El testículo de tipo tubular o de distribución restringida es característico de las especies de teleósteos más evolucionadas. Este tipo testicular está formado por tubos ciegos, regularmente orientados, entre la túnica albugínea y una cavidad central en la que los espermatozoides son liberados. Los quistes con las espermatogonias más indiferenciadas están localizados en la parte ciega de los tubos, cerca de la túnica albugínea, y conforme estas células se van dividiendo y diferenciando, los quistes se van movilizand

o a lo largo de los túbulos hacia la cavidad central donde ocurre la espermiación, es decir, dónde los quistes se abren para liberar los espermatozoides.

También aparecen formas intermedias entre los tipos de distribución de espermatogonias, restringida y no restringida, en distintos grupos como Perciformes (*Oreochromis niloticus*, Vilela y col., 2003), Pleuronectiformes, (*Solea senegalensis*, García-López y col., 2005) o Gadiformes (*Gadus morhua*, Almeida y col., 2008). En estos grupos, la espermatogonia diferenciada muestra una preferencia, aunque no exclusiva, para localizarse cerca de la túnica albugínea. El resultado es una zonación de los testículos: los estados tempranos de desarrollo aparecen en la periferia y los estados avanzados de desarrollo se encuentran cerca de los tubos colectores; esta situación se produce más por el incremento del número de células espermáticas durante el desarrollo de los quistes que por el movimiento de los quistes en desarrollo (Almeida y col., 2008).

El testículo, en cualquier caso, está formado por un tejido intersticial y un tejido tubular o lobular. El tejido intersticial está formado por células endocrinas o células de Leydig, células propias del sistema inmunitario como macrófagos, granulocitos y linfocitos, fibroblastos, células mioideas o peritubulares, vasos sanguíneos y fibras de colágeno (Grier, 1981; Nagahama, 1983; Loir y col., 1995). El tejido tubular o lobular está delimitado por una membrana basal y por células mioideas peritubulares y alberga el epitelio germinal. El epitelio germinal contiene únicamente dos tipos de células: las células germinales y las células de Sertoli. Las células germinales pueden encontrarse en diferentes estados de desarrollo, dependiendo de la edad de los individuos macho y/o de la estación y solamente pueden sobrevivir si presentan una interacción continua y cercana con las células de Sertoli. Así el número de células de Sertoli determina la

capacidad espermatogénica de un testículo y es importante en la regulación de la espermatogénesis (Schulz y col., 2010). Ambos tipos celulares forman quistes dentro de los cuales se desarrollan y maduran las células germinales, siendo el desarrollo de todas las células germinales, dentro de un mismo quiste, sincrónico (Grier, 1981; Billard y col., 1982; Nagahama, 1983; Callard, 1991).

La espermatogénesis quística es propia de los vertebrados anamniotas (Grier, 1981; Billard y col., 1982; Nagahama, 1983; Callard, 1991, 1996) y presenta dos grandes diferencias con la estructura tubular presente en los vertebrados superiores:

- En los túbulos seminíferos, las extensiones citoplasmáticas de las células de Sertoli forman quistes que envuelven a un grupo de células germinales que se desarrollan clonal y sincrónicamente.
- Las células de Sertoli son capaces de proliferar en la edad adulta y no únicamente hasta la pubertad (Schulz y col., 2005) como ocurre en los vertebrados amniotas. En estos últimos las células de Sertoli proliferan hasta la pubertad momento en el cual sólo las espermatogonias y unos pocos espermatocitos tempranos están presentes en el epitelio germinal, es decir, el testículo contiene un número fijo de células de Sertoli que sustentan las sucesivas olas de espermiogénesis. Así una célula de Sertoli determinada sustenta al mismo tiempo diferentes estados de desarrollo de las células germinales.

Además, los diferentes clones se encuentran en diferentes estados de desarrollo formando quistes de diferente tamaño y desarrollo.

De esta manera, si se comparan estos dos tipos de espermatogénesis, quística y no quística, se podría decir que las células de Sertoli quísticas podrían ser más eficientes en lo que hace referencia

al desarrollo de las células germinales ya que hay un bajo porcentaje de apoptosis de células germinales y, consecuentemente, una alta tasa espermatogénica. Las células de Sertoli no quísticas, por el contrario, están más diversificadas y regionalizadas en relación con el requerimiento complejo necesario para el desarrollo, al mismo tiempo, de diferentes estados de desarrollo de células germinales.

Espermatogénesis

Etapas

La espermatogénesis es un proceso altamente organizado y coordinado en el que la espermatogonia diploide se divide y se diferencia en sucesivas etapas hasta llegar a espermatozoide. Este proceso está conservado en vertebrados y en base a características morfológicas y funcionales (Scott, 1987; Miura, 1999), puede ser dividido en cuatro fases diferentes:

- Fase mitótica. En esta fase la células germinales se presentan como diferentes generaciones de espermatogonias A, incluidas las células madre germinales (Aund* y Aund) y las espermatogonias A diferenciadas. Esta población de células se corresponde con las células madre de la espermatogénesis y se autorrenuevan (Miura, 1999). La fase mitótica muestra pequeñas variaciones en el número de tipos celulares que la constituyen en las distintas especies (Bennington, 1936; Barr, 1963; Lehrich, 1967; Carrillo y Zannuy, 1977; Van der Horst, 1978; Grier y col., 1980; Lahnsteiner y Patzner, 1990; Koulis, 2002) debido a que el número de mitosis que tiene lugar en la etapa de proliferación y el punto de inflexión, en el cual el proceso de espermatogénesis continúa irreversiblemente hasta la aparición de espermatozoides, son específicos de la especie (LeGac y Loir, 1999; Miura, 1999). En cualquier caso, el inicio de la espermatogénesis desencadena una serie de divi-

siones mitóticas muy rápidas que producen un aumento de espermatogonias por quiste que se denominan espermatogonias B (tempranas y tardías).

- Fase meiótica. Las espermatogonias B tardías se diferencian en espermatoцитos primarios que entran en la profase de la primera división meiótica, originando al final de la misma espermatoцитos secundarios. Los espermatoцитos secundarios entran en la metafase de la segunda división meiótica generando, al final de la división, células haploides o espermátidas.
- Fase espermiogénica. En las espermátidas haploides se producen una serie de cambios morfológicos que las transforman en espermatozoides. Al final de la espermiogénesis, cuando los puentes intercelulares se han roto y los espermatozoides se han individualizado, las uniones complejas entre las células de Sertoli sufren una remodelación que termina con la apertura del quiste y la liberación de los espermatozoides hacia la luz tubular. No está claro si la liberación de espermatozoides está facilitada por células mioides y/o por el citoesqueleto de las células de Sertoli.
- Fase de maduración. En esta fase los espermatozoides adquieren la motilidad y la capacidad de fertilización.

tidas (E1, E2 y E3), espermatozoides (SZ) y mitosis (m).

Mientras que en la fase mitótica el número de generaciones de espermatogonias viene determinado genéticamente para cada especie, las otras fases presentan grandes similitudes entre las diferentes especies de vertebrados (Nóbrega y col., 2009).

Según progresa la espermatogénesis hay una disminución relativa de quistes de espermatogonias diferenciadas y de espermátocitos y un aumento de quistes de espermátidas y espermatozoides como ha sido descrito en varias especies de teleósteos (Bhatti y Al-Daham, 1978; Sinha y Mondal, 1981; Patzner y Seiwald, 1987; Lahnsteiner y Patzner, 1990; Chaves-Pozo y col., 2005).

En dorada, utilizando la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) en el ADN de las células que se encuentran en la fase S, se ha descrito la actividad proliferativa del testículo en las distintas etapas del ciclo reproductor (Chaves-Pozo y col., 2005). Así, un gran número de células madre, células de Sertoli, quistes de espermatogonias A y B y de espermatocitos son BrdU positivos. Como ya se mencionó anteriormente, las células germinales pertenecientes al mismo quiste proliferan de forma sincrónica, sin embargo no todas las células de Sertoli del mismo quiste proliferan de forma simultánea. Además, dependiendo de la especie, la proliferación de las células de Sertoli y las células germinales del mismo quiste puede ser simultánea o alternada (Chaves-Pozo y col., 2005; Schulz, 2005).

En algunas especies, la liberación de las células germinales tiene lugar cuando se alcanza el estado de espermatida o, incluso, el de espermatocito, y la espermiogénesis y/o la meiosis son completadas en la luz del túbulo seminífero. Este tipo de espermatogénesis es llamada espermatogénesis semiquística (Mattei, 1993) y es encontrada en diferentes gru-

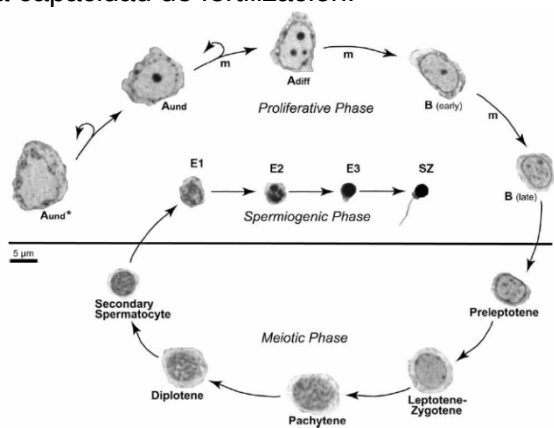


Figura 3. Etapas del proceso de espermatogénesis (Modificado por Schulz y col., 2010). Espermatogonias tipo A indiferenciadas (Aund* y Aund), espermatogonia tipo A diferenciada (diff), espermatogonia tipo B temprana (early) y tardía (late), espermá-

pos taxonómicos, tales como Opheliidae (Mattei, 1993), Scorpaenidae (Muñoz y col., 2002), Bleniidae (Lahnsteiner y Parzner, 1990), Corydoradinae (Spadella y col., 2007) y Soleidae (García-López y col., 2005).

Hay casos, sin embargo, en donde los espermatozoides no están individualizados durante su liberación. A pesar de ello, el espermatozoide es formado en los quistes cuando las células de Sertoli secretan una cápsula alrededor de un grupo de espermátidas, creando espermatóforos (Grier, 1984). También se han descrito uniones entre espermátidas diferenciadoras y células de Sertoli en el pez mosquito (Arenas y col., 1995).

Células espermatoogénicas

Las células madre germinales se definen como las células más indiferenciadas de la serie germinal. Son células simples, es decir, no están conectadas, a través de puentes citoplasmáticos, a otras células madre.

Las espermatogonias A indiferenciadas residen en un nicho creado por las células de Sertoli y por la matriz extracelular generando unas características microambientales que les permiten conservar su estado indiferenciado (Li y Xie, 2005; Hofmann, 2008). El futuro de cada célula madre estará determinado por el ambiente en el que crece: si una célula madre germinal es expuesta a un nicho que favorece la autorrenovación, tendrá lugar un proceso de autorrenovación, mientras que un desplazamiento hacia otro nicho o un cambio en el nicho favorecerá la diferenciación (Kostereva y Hofmann, 2008; Oatley y Brinster, 2008). De esta manera, una división que genera autorrenovación de una célula madre proporciona dos células hijas no conectadas entre sí, mientras que un par de espermatogonias unidas a través de puentes citoplasmáticos son el resultado de una mito-

sis diferenciadora (Oatley y Brinster, 2008).

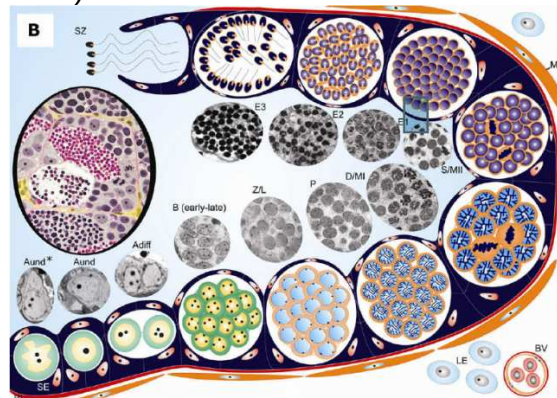


Figura 4. Testículo de pez y representación del aspecto morfológico de los diferentes estados de desarrollo de las células germinales en pez cebra (Modificado por Schulz y col., 2010).

Estudios morfométricos han demostrado que existe una disminución considerable en el volumen de las células germinales del pez cebra desde la espermatogonia indiferenciada ($667 \mu\text{m}^3$) hasta la última generación de la espermatogonia tipo B ($82 \mu\text{m}^3$) (Leal y col., 2009). Simultáneamente, el número de células germinales así como el de células de Sertoli incrementan por quiste espermatogonial (de 1 a 208 y de 1 a 11, respectivamente). Se puede señalar también que las espermatogonias del pez cebra atraviesan ocho rondas de mitosis antes de diferenciarse a espermatocitos, es decir, hay nueve generaciones de espermatogonias.

Además del volumen nuclear, que también disminuye dramáticamente desde la espermatogonia tipo A indiferenciada ($336 \mu\text{m}^3$) hasta la espermatogonia tipo B ($53 \mu\text{m}^3$), la cantidad y distribución de cromatina y de orgánulos/estructuras citoplasmáticas también cambian en el pez cebra.

La espermatogonia A diferenciada se produce gracias a la mitosis de la espermatogonia A indiferenciada. La espermatogonia A diferenciada presenta un potencial de autorrenovación más reducido pero los dos tipos de espermatogonias comparten características morfológicas (presen-

tan nuage, tienen una envoltura nuclear irregular, son células de gran tamaño en el proceso espermatogénico...). La espermatogonia A diferenciada forma quistes de dos a ocho células germinales. Su núcleo es redondeado/oval y no contiene o contiene cantidades muy pequeñas de nuage, mostrando uno o más nucleolos. Además son células algo menores que las espermatogonias A indiferenciadas y contienen menor cantidad de heterocromatina en el núcleo y un volumen citoplasmático mayor.

La espermatogonia tipo B presenta varias generaciones. El número de generaciones de la espermatogonia tipo B varía entre las especies (Ando y col., 2000). Así se ha encontrado 14 generaciones en gupi (Billard, 1969), 10-12 en el pez mosquito (Geiser, 1924), 9 en el pez cebra (Leal y col., 2009), en la gallineta nórdica (Moser, 1978) y en la trucha arco iris (Loir, 1999) o 3 en el salmonete (Van del Horst, 1978). Todas las células de una misma generación y procedentes de una misma célula madre germinal están interconectadas mediante puentes citoplasmáticos, estructura que se conoce como un sincitio clonal en un quiste (Loir y col., 1995). Debido a que ciertas especies presentan varias generaciones de espermatogonias B se puede hacer una diferenciación basada en el tamaño nuclear o celular y en el número de células por quiste, desde las más tempranas espermatogonias tipo B hasta las más tardías (B tempranas y B tardías, respectivamente). Las generaciones de espermatogonias tipo B pueden ser numeradas ya que cada especie presenta un número determinado de espermatogonia tipo B (Schulz y col., 2005; Leal y col., 2009). Tanto en mamíferos (De Rooij y Russell, 2000) como en peces, la espermatogonia tipo B se divide más rápidamente, del orden de 5 veces más, que la espermatogonia tipo A en el pez gato africano (Schulz y col., 2005). La espermatogonia tipo B muestra un decrecimen-

to progresivo del volumen celular y nuclear con un pequeño halo de citoplasma rodeando un núcleo oval/circular que gradualmente muestra más heterocromatina.

La última generación de espermatogonias tipo B sufre duplicación y da lugar a espermatocitos primarios, los cuales inician la primera división meiótica entrando en una larga profase dividida en varias etapas: preleptotene, leptotene, cigotene, paquitene y diplotene. Seguidamente finaliza la primera división meiótica o meiosis reduccional para dar lugar a las células haploides o espermátidas.

Los criterios utilizados para identificar las células meióticas están basados principalmente en características nucleares, tales como el tamaño, la forma, el grado de condensación de los cromosomas y figuras metafásicas asociadas. En los espermatocitos del pez cebra, en la fase de leptotene/zygotene el núcleo es mayor (~5.1 μm ; Leal y col., 2009) y más redondeado en comparación con la última generación de la espermatogonia tipo B, la cromatina es clara y muestra pequeños puntos de heterocromatina rodeando la envoltura nuclear. Los espermatocitos en paquitene son las células meióticas germinales más frecuentes y tienen un núcleo grande (~6.0 μm ; Leal y col., 2009) y denso, con los cromosomas apareciendo como líneas oscuras desde la envoltura nuclear hasta el centro del núcleo. Los espermatocitos primarios en diplotene se encuentran frecuentemente junto con figuras metafásicas (metafase 1): en ellos, los cromosomas alcanzan su máximo grado de condensación y se encuentran cerca de la envoltura nuclear.

Los espermatocitos secundarios, resultado de la meiosis I, son células pequeñas con un núcleo denso (~3.9 μm ; Leal y col., 2009), normalmente encontrado junto con figuras metafásicas (metafase II).

Cuando las espermatogonias tipo B sufren las dos divisiones meióticas se

producen cuatro células haploides, las espermatidas, que sufren cambios morfológicos que lideran su diferenciación hacia espermatozoides. Estos cambios incluyen la condensación nuclear, la eliminación de orgánulos y de citoplasma, la formación del flagelo y la reorganización de los orgánulos celulares a lo largo del citoplasma espermático (Jamieson, 1991). Estas modificaciones pueden explicar las modificaciones en el volumen de los quistes durante esta fase en tilapia (Schulz y col., 2005).

Las espermatidas continúan con el proceso de diferenciación y pueden ser clasificadas en diferentes tipos en relación con la condensación nuclear: E1, espermatidas tempranas, E2, espermatidas intermedias y E3, espermatidas finales (Schulz y col., 2005).

Regulación de la espermatogénesis

Hormonas hipofisarias

Tanto en teleósteos como en otros vertebrados, la espermatogénesis está regulada por hormonas. Las hormonas principales implicadas en esta regulación son las gonadotropinas (GTHs) que son sintetizadas y secretadas por la hipófisis. Sin embargo, estas hormonas no actúan de forma directa sobre la espermatogénesis, sino que estimulan la producción, por parte de distintos tipos celulares, de moléculas intermediarias, las cuales regulan, en última instancia, la maduración de las células germinales (Miura, 1999). Las GTHs actúan sobre las células de Sertoli y las células de Leydig e inducen la secreción de esteroides y/o factores de crecimiento que intervienen en la compleja red de interacciones celulares que regulan las funciones testiculares (Miura, 1999).

En la mayor parte de las especies de teleósteos estudiadas, existe una dualidad de GTHs que son estructuralmente homólogas a la hormona folículo estimulante

(FSH) y a la hormona luteinizante (LH) de mamíferos (Schulz y col., 2001).

Hay dos características de esta regulación hormonal que son de especial importancia: la especificidad con la que las GTHs interactúan con sus receptores y el tipo celular en el que se expresa el receptor. En mamíferos, FSH y LH interactúan con sus receptores: el receptor de FSH (FSHR) se expresa en las células de Sertoli y el receptor de LH (LHR) se expresa en las células de Leydig, respectivamente, de una manera muy específica (Huhtaniemi y Themmem, 2005). Estas dos hormonas desempeñan funciones específicas en el testículo aunque pueden tener un pequeño solapamiento en sus actividades biológicas a concentraciones fisiológicas.

En general, el FSHR muestra preferencia por la FSH pero también se puede activar con LH (pez gato africano, García-López y col., 2008; bagre de canal, Sampath Kumar y col., 2000; anguila japonesa, Kazeto y col., 2008; pez cebra, So y col., 2005). Sin embargo, la activación del FSHR requiere unas concentraciones de LH elevadas. Desde un punto de vista evolutivo es interesante saber que un FSHR avícola se comporta de manera similar en relación con la activación con LH (Wakabayashi y col., 1997). El LHR también puede ser activado por FSH, pero se requiere que las concentraciones de FSH se encuentren muy por encima de los niveles máximos en plasma, por lo que el LHR podría ser considerado fisiológicamente específico de la LH. Una posibilidad para explicar la estimulación mediada por FSH de la esteroidogénesis de las células de Leydig es asumir que estas células, en peces, expresan el gen de LHR y el gen de FSHR. En anguila (Ohta y col., 2007) y en el pez gato africano (García-López, 2008) el gen que codifica para el FSHR se expresa tanto en las células de Leydig como en las células de Sertoli mientras que el gen que codifica para el LHR sólo se expresa en las células de Leydig.

Hormonas esteroideas

Los esteroides sexuales, progesterona, andrógenos y estrógenos, son principalmente producidos en las gónadas.

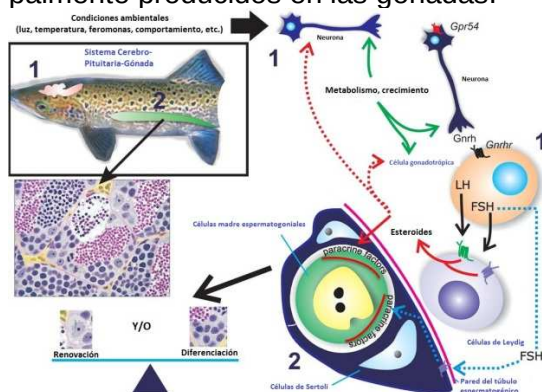


Figura 5. Representación esquemática del sistema endocrino regulador de la reproducción. (Modificado por Schulz R.W. y Nóbrega R.H., 2011).

Los niveles en plasma de estas hormonas muestran importantes variaciones durante la maduración gonadal masculina. En general, los estrógenos son considerados hormonas femeninas pero también se producen en los vertebrados masculinos (Schlinger y Arnold, 1992; Hess y col., 1995; Betka y Callard, 1998). En teleósteos machos, el E_2 está presente en el suero sanguíneo aunque en concentraciones relativamente bajas (Miura y col., 1999; Amer y col., 2001; Chaves-Pozo y col., 2008) y muestran una elevación transitoria al comienzo del ciclo reproductivo en trucha (Gómez y col., 1999) y en la etapa de post-puesta en dorada (Chaves-Pozo y col., 2008). El nivel de andrógenos (T y 11-KT) incrementa a medida que avanza la espermatogénesis y disminuye en la espermiación en trucha (Gómez y col., 1999) mientras que en dorada estas dos hormonas tienen funciones diferentes en la fisiología testicular ya que tienen valores diferentes en las diferentes etapas del ciclo reproductor (Chaves-Pozo y col., 2008). Durante el ciclo reproductivo de los salmónidos, hay dos picos de dihidropro-

gesterona (DHP) en el plasma sanguíneo: i) un pico grande es observado en la estación de desove y ii) otro pequeño pico durante el transcurso de la proliferación de las espermatogonias (Depeche y Sire, 1982; Scott y Sumpter, 1989; Vizziano y col., 1996). En conjunto, todos estos datos indican que las hormonas esteroideas juegan un papel importante en el control de la espermatogénesis en peces.

Andrógenos

Los andrógenos son hormonas sexuales esteroideas producidas principalmente en la gónada (Takeo y Yamashita, 1999; Todo y col., 1999; Ikeuchi y col., 2001). Los receptores de andrógenos (AR) son expresados en las células de Sertoli y en el tejido intersticial pero no en las células germinales (Ikeuchi y col., 2001), sugiriendo que los andrógenos desarrollan su actividad biológica a través de las células somáticas testiculares. Para estas hormonas se han descrito dos subtipos de receptores andrógenos en peces, ARA y ARb.

Los andrógenos más conocidos son la T y la 11-KT. Estas dos hormonas pueden presentar funciones similares pero también actúan de forma opuesta. La 11-KT fue identificada por primera vez por Idler y col. (1961) como el mayor esteroide andrógeno en machos de *Oncorhynchus nerka*.

En truchas prepuberales, tanto la T como la 11-KT tienen efectos similares en la expresión de diferentes genes, incrementando o disminuyendo su expresión (LeGac y col., 2008). Algunos de estos genes, que regulan la espermatogénesis y la esteroidogénesis, se expresan en las células de Sertoli. Así por ejemplo, la expresión del gen de la hormona antimülleriana (AMH), que inhibe la diferenciación de las espermatogonias, es inhibido por la T y la 11-KT. Además, las células peritubulares, es decir, células mioideas con características contráctiles, son células di-

ana de respuesta a andrógenos en vertebrados superiores.

Por otro lado, la T y la 11-KT se comportan de forma diferente en la expresión de otros genes. Le Gac y col. (comunicación personal) observaron que la expresión de 56 genes se incrementó debido a su exposición a 11-KT pero no frente a T y que 260 genes vieron incrementada su expresión cuando eran sometidos a tratamientos con T pero no con 11-KT. Estos hallazgos señalan la posibilidad de efectos específicos para cada uno de estos andrógenos.

En teleósteos se ha descrito que la síntesis de 11-KT en el testículo o en tejidos extra-testiculares puede ocurrir a partir de pregnenolona vía progesterona, 17 α -hidroxiprogesterona, androstenediona, 11 β -hidroxiandrostenediona y 11-ketoandrostenediona (OA) (Mayer y col., 1990a; Goos y Consten, 2002). De acuerdo con esto, machos castrados e implantados con OA muestran niveles plasmáticos elevados de 11-KT (Mayer y col., 1990b; Borg y col., 1993), y el tratamiento de machos control con ambas hormonas, OA y 11-KT, puede promover el desarrollo testicular (Goos y Consten, 2002).

De esta manera se puede concluir que los andrógenos son muy importantes en el proceso completo de la espermatogénesis, o, al menos, en algunos pasos tales como la multiplicación de las espermatogonias o la formación o maduración de los espermatoцитos (Remacle, 1976; Billard y col., 1982; Fostier y col., 1983; Billard, 1986; Borg, 1994; Nagahama, 1994). También pueden participar en el inicio de la pubertad (Miura y col., 1991a,b; Cavaco y col., 1998), además de inducir la espermiación en algunas especies, aunque de forma mucho menos efectiva que las progestinas (Ueda y col., 1985).

Estrógenos

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas que se unen a receptores de estrógenos (REs) nucleares que actúan como ligandos de factores de transcripción. Los REs se expresan, mayoritariamente, en las células somáticas testiculares y en las células germinales haploides masculinas en peces (Chang y col., 1999; Miura y col., 1999; Bouma y Nagler, 2001; Wu y col., 2001; Menuet y col., 2002; Ito y col., 2007). En peces se han descrito tres tipos de REs: RE_a, RE_{b1} y RE_{b2}.

El E₂ tiene efectos reguladores (directos e indirectos) en la expresión de genes importantes para la regulación de la esteroidogénesis y la espermatogénesis. Así se ha comprobado que los estrógenos controlan la homeostasis del ácido retinoico en el testículo, el cual es requerido para la proliferación y diferenciación de las espermatogonias no diferenciadas en ratón (Zhou y col., 2008), aunque parece menos relevante en el pez cebra (Alsop y col., 2008). También se ha demostrado que los estrógenos inhiben la expresión del gen que codifica para AMH en trucha por lo que no está claro que los estrógenos estimulen la renovación de las células madre de las espermatogonias (Alsop y col., 2008) como inicialmente se propuso (Miura y col., 1999; Song y Gutzeit, 2003). Dosis suprafisiológicas (mayores a 100 ng/ml) de estrógenos inhiben la proliferación celular, inducen apoptosis de las espermatogonias indiferenciadas, aceleran los últimos eventos de la espermatogénesis e inducen la infiltración de granulocitos acidófilos, principal célula fagocítica de dorada (Chaves-Pozo y col., 2007).

Por otra parte, estudios con E₂ han permitido comprobar que hay una serie de genes que podrían ser considerados como biomarcadores frente a una exposición a estrógenos y que están involucrados en diferentes procesos biológicos tales como la proliferación celular, el metabolismo de

lípidos, el metabolismo y plegado de proteínas, el transporte y la comunicación celular en besugos macho (Pinto y col., 2006). Sin embargo, el tratamiento con E_2 a truchas macho prepuberales produce una variación en la expresión de genes que no fue superior a 1.5-3 veces de su expresión normal, excepto para el gen que codifica para la vitelogenina (biomarcador frente a la exposición a estrógeno), que se expresó de 10 a 30 veces más.

En peces en proceso de madurez, dosis altas de estrógenos reducen el volumen del fluido seminal, incrementan la densidad espermática y pueden provocar esterilidad (Lahnsteiner y col., 2006).

Regulación molecular de la espermatogénesis

La mitosis de las espermatogonias es un proceso con el que se consigue una renovación lenta de las espermatogonias, por un lado, y una rápida proliferación de espermatogonias diferenciadas que entran en meiosis, por otro, para dar lugar finalmente a un gran número de espermatozoides (Clermont, 1972). Estos dos tipos de mitosis de las espermatogonias son reguladas por diferentes mecanismos a través de las hormonas esteroideas.

Autorrenovación de las células madre de las espermatogonias

Los tratamientos con E_2 no promueven una proliferación rápida de las espermatogonias ni de la meiosis. Sin embargo, diferentes estudios han evidenciado que es el E_2 quien regula la renovación de las espermatogonias.

Estudios in vivo han determinado que la renovación de las espermatogonias es estimulada por E_2 mientras que es inhibida por tamoxifeno (antagonista del receptor de estrógenos) en la anguila japonesa (Miura y col., 1999). Además estudios in vitro han demostrado que 10 pg/mol de E_2 son suficientes para inducir las divisiones

de renovación en cultivos celulares testiculares (Miura y col., 1999; Amer y col., 2001). Sin embargo, dosis altas tienen un efecto inhibitor en medaka (Song y Gutzeit, 2003).

Los mecanismos moleculares que regulan como los estrógenos inducen la renovación de las espermatogonias no son muy conocidos en el momento actual (Miura y col., 2003, 2007). En la anguila japonesa se ha comprobado que la espermatogénesis está relacionada con una sustancia denominada eSR34 (sustancias similares a factores de crecimiento de las células endoteliales) cuya expresión aumenta en presencia de E_2 pudiéndose concluir que eSR34 es un factor de autorrenovación de las células madre de las espermatogonias.

Proliferación de las espermatogonias

El inicio de la producción de espermatozoides tiene lugar cuando se pasa de una lenta mitosis de las espermatogonias, basada únicamente en la autorrenovación, a una proliferación rápida que las lleve hasta la meiosis. La FSH es la hormona clave para iniciar la espermatogénesis mientras que la LH es más importante en los estadios finales de la maduración (Ohta y col., 2007). En peces, la función principal de la FSH, en el inicio de la proliferación de las espermatogonias, es estimular la producción de esteroides inductores de la espermatogénesis como la 11-KT (Miura y col., 1991a; Kamei y col., 2005; Ohta y col., 2007). En varios peces teleósteos se ha demostrado que la 11-KT es sintetizada en el testículo mediante el estímulo de las GTHs, detectándose niveles altos en el suero durante la espermatogénesis (Billard y col., 1982). La función principal de la 11-KT es inducir la espermatogénesis desde la proliferación de las espermatogonias hasta la espermiogénesis (carpín: Kobayashi y col., 1991; anguila: Miura y col., 1991a; Hucho perryi: Amer y col., 2001). En general, la 11-KT estimula la

producción de AMH (Miura y col., 2002) y activina B (Miura y col., 1995), ambas sustancias son de gran importancia en el inicio de la espermatogénesis en peces. La AMH, por otro lado, es secretada como una proteína de señalización intracelular. En el testículo de anguila, la expresión del ARNm de AMH es inhibida por 11-KT. Para que la espermatogénesis se lleve a cabo es necesaria la supresión de la expresión de AMH (Schulz y col., 2010). La activina B se encuentra en el testículo al inicio de la espermatogénesis después de la estimulación con la gonadotropina coriónica humana (hCG) en la anguila japonesa y es capaz de inducir la proliferación de las espermatogonias pero no induce la meiosis o estadios germinales más avanzados (Miura y col., 1995). De esta forma, la AMH y la activina B tienen funciones opuestas en la diferenciación de la proliferación rápida de las espermatogonias, presentado la activina B un efecto estimulador mientras que la AMH tiene un papel supresor de este proceso.

Contaminación por disruptores endocrinos.

La importancia que actualmente se le da a la posibilidad de que los disruptores endocrinos puedan afectar a la reproducción de las diferentes especies y, especialmente, a la humana es más que evidente. En peces, existen muchos indicios que relacionan la contaminación natural (producida por estrógenos como el estradiol o la estrona) o antrópica (como el estrógeno sintético etinilestradiol) que los disruptores endocrinos presentan con la reducción del éxito reproductivo que afecta a las poblaciones silvestres, afectando tanto a la fisiología como a la morfología reproductiva. La presencia en las aguas superficiales de estrógenos es un fenómeno natural, el problema surge cuando en ella también encontramos concentraciones de estrógenos artificiales, especialmente debida a la utilización masiva de

píldoras anticonceptivas (Desbrow y col., 1998; Larsson y col., 1999; Ternes y col., 1999; Aherne y Briggs, 1989; Kolpin y col., 2002a; Kolpin y col., 2002b), los cuales, aunque en muchos casos se encuentran en concentraciones menores que los de origen natural, presentan un potencial en peces mucho mayor (Segner y col., 2003b; Thorpe y col., 2003) debido a su larga vida media y su tendencia a acumularse en los seres vivos (Lange y col., 2001; Larsson y col., 1999).

Ejemplos de esta relación son encontramos en diversos estudios con consecuencias tales como son la afección del desarrollo y diferenciación sexual normal (Andersen y col., 2003; Metcalfe y col., 2001, Van Aerle y col., 2002; Van den Belt y col., 2003, Weber y col., 2003), de la fecundidad (Lange y col., 2001; Scholz y Gutzeit, 2000; Van den Belt y col., 2002), o del comportamiento reproductor (Balch y col., 2004) reducción el éxito de la fertilización o viabilidad de los embriones procedentes descendientes de adultos expuestos (Hill y Janz, 2003; Lange y col., 2001; Segner y col., 2003a; Nash y col., 2004), inducción de la producción de proteínas específicas femeninas en ejemplares de peces masculinos (Tyler y Routledge, 1998) y de la gonopodia en las hembras (Bortone y Davis, 1994), reducción de la cantidad de esperma (Haubregue y col., 2000), modificación de los ratios sexuales (Larsson y col., 2000) así como dar prevalencia a la intersexualidad (Jobling y col., 1998).

OBJETIVOS

El presente trabajo propone determinar el efecto de estrógenos (17 β -estradiol, E₂) y andrógenos (11-ketoandrostenediona, OA) en el testículo de machos adultos o sexualmente maduros de pez cebra. Para ello nos planteamos determinar el efecto de E₂ y de E₂ seguido de OA sobre:

- el índice gonadosomático.
- la capacidad de proliferación de los distintos tipos celulares germinales presentes en el testículo.
- la capacidad de diferenciación de las espermatogonias A indiferenciadas.
- la expresión de genes marcadores de algunos tipos celulares testiculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para la realización de la investigación se utilizaron ejemplares macho de pez cebra, *Danio rerio* (Cyprinidae, Cyprini-forme, Teleosteo), sexualmente maduros, con un peso corporal medio de aproximadamente 0,27 gramos y con una edad de 9 meses. Los ejemplares se mantuvieron en el acuario de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Utrecht en tanques de 200 litros de agua dulce con flujo constante con una tasa de renovación del 20% del volumen del acuario/hora, 6ppm de oxígeno disuelto. Los peces fueron alimentados dos veces al día con pienso comercial (Trouvit) y fueron sometidos a ayuno 24 horas antes de los muestreos.

El cultivo animal bajo condiciones estándar para esta especie, el manejo y la experimentación realizados fueron coherentes con las regulaciones nacionales holandesas y fueron aprobados por el Comité de la Facultad de Ciencias para el cuidado y uso de animales en Utrecht (Holanda).

Los ejemplares fueron tratados in vivo con una disolución 10nM de E₂ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en agua desionizada durante tres semanas en tanques de vidrio que contenían 13 dm³, renovando esta disolución cada 24 horas. La dosis utilizada fue elegida ya que se conocía su capacidad para alterar la espermatogénesis de los peces cebra adultos (Van der Ven y col., 2003). A las tres semanas un lote de ejemplares continuó el tratamiento con E₂ durante dos semanas más y otro

lote de ejemplares fue expuesto además a una disolución de 10 nM de E₂ más 100 nM de 11-ketoandrostenodiona (OA). Un lote de ejemplares sin ninguno de los tratamientos anteriormente descritos fue utilizado como control.

Obtención de muestras

A las cinco semanas del inicio de los tratamientos (E₂, E₂+OA y control) se muestrearon diez ejemplares de cada uno de ellos. Los ejemplares fueron colocados en agua helada y pesados. A continuación se obtuvieron los testículos que fueron pesados y se calculó el índice gonadosomático (IGS) como 100x[Pg/Pc] en donde Pg corresponde al peso de la gónada (en gramos) y Pc corresponde al peso corporal (en gramos). Los testículos fueron procesados para su estudio histológico, análisis inmunocitoquímico de proliferación celular y análisis de expresión de genes.

Seis horas antes de cada muestreo, los ejemplares fueron expuestos a una concentración de 4mg/ml de BrdU en tampón fosfato salino (PBS), pH 7,4 estéril; el BrdU es un análogo de la timidina que se incorpora al ADN de las células que se encuentran en la fase de síntesis (fase S) del ciclo celular.

Procesamiento de muestras

Microscopía óptica

Los testículos fueron fijados en una solución de Methacarn (60% metanol, 30% cloroformo y 10% ácido acético) durante 16 horas. Posteriormente fueron deshidratados en concentraciones crecientes de etanol (70%, 80%, 90%, 95% y 100%) durante 4 horas y embebidos en resina, Technovich 7100, durante 16 horas a 37°C y, posteriormente, con la resina y el endurecedor Technovich 7100 durante una hora a temperatura ambiente y durante 16 horas a 37°C.

Finalmente se realizaron secciones de 3 µm de grosor con el micrótopo de

rotación HM 340 E que fueron colocadas de 5 en 5 en portaobjetos.

Las imágenes de las preparaciones sometidas a las diferentes técnicas se obtuvieron empleando un microscopio convencional Olympus AX70, una cámara digital Nikon DXM1200 y el paquete de software Nikon ACT-1, versión 2.63 (Nikon Corporation 2000).

Azul de toluidina

Al menos tres secciones de testículo de cada ejemplar y de cada tratamiento fueron teñidas con azul de toluidina. Para ello, las secciones fueron introducidas en azul de toluidina durante 1 minuto y en agua abundante durante 10 minutos y fueron aclaradas en xilol durante 10 minutos (2 lavados de 5 minutos). Después se dejaron secar y se introdujeron en xilol 100%. Finalmente las muestras fueron cubiertas con un cubreobjetos utilizando el pegamento Pertex Mounting Media. Estas muestras fueron utilizadas para el estudio histológico y la caracterización morfológica del testículo tras los diferentes tratamientos. Además en ellas se realizó el recuento de los diferentes estados de desarrollo de las células germinales previos a la producción de los espermatozoides.

Inmunocitoquímica

Con el fin de poder determinar las células germinales que se encontraban replicándose durante el periodo de exposición al BrdU, secciones de cada uno de los ejemplares tanto de los dos tratamientos con hormonas como del grupo control fueron sometidas a una técnica inmunocitoquímica indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal comercial anti-BrdU (Caltag). Para la detección de la proliferación celular, las secciones de testículo fueron sumergidas en agua destilada durante 1 o 2 minutos. A continuación fueron incubadas en ácido periódico al 1% en agua purificada durante 30 minutos a 60°C y lavadas varias veces con agua abundante

durante 10 minutos, agua destilada durante 5 minutos y PBS1x (400 gr de NaCl, 10 gr de HCl, 72 gr de Na₂HPO₄·2H₂O y 10 gr de KH₂PO₄ en 50 litros de agua destilada, pH 7,4) durante 15 minutos (3 veces durante 5 minutos cada una). Posteriormente fueron incubadas en una solución inhibidora de la peroxidasa endógena (peróxido de hidrógeno al 1% en PBS1x) durante 10-15 minutos, lavadas con PBS1x durante 15 minutos (3 veces durante 5 minutos cada una) e incubadas con un agente de bloqueo de la unión inespecífica del anticuerpo (suero de conejo al 5%, albúmina de suero bovino (BSA) al 1% diluidos en PBS1x) durante 10 minutos a temperatura ambiente y lavadas rápidamente en PBS1x. Las muestras fueron incubadas con el suero anti-BrdU a la dilución de trabajo 1:80 en PBS1x con BSA al 1% durante una hora a temperatura ambiente. Seguidamente fueron lavadas tres veces en PBS1x, durante 5 minutos cada vez, e incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario contra la inmunoglobulina (Ig) G de ratón conjugado con peroxidasa (Immunologic). Posteriormente fueron lavadas cuatro veces en PBS1x, durante 5 minutos cada vez. La actividad peroxidasa, en todos los casos, fue revelada incubando las secciones en 3,3'-diaminobencidina (DAB) (25mg-50mg) en PBS1x con 17 µl de H₂O₂ al 35% durante 3-7 minutos a temperatura ambiente y, posteriormente, fueron lavadas en agua destilada durante 5 minutos y contrastadas con hematoxilina durante 10-15 minutos y lavadas rápidamente en agua destilada. Posteriormente, todas ellas fueron lavadas con agua corriente durante 3 minutos y se dejaron secar. A continuación se eliminaron los restos de plástico y se montaron con pegamento Pertex Mounting Media (Leica Microsystems).

Determinación del Índice BrdU

El índice BrdU se determinó para las espermatogonias A indiferenciadas y las espermatogonias A diferenciadas. Para ello se utilizaron las secciones sometidas a la técnica inmunocitoquímica para detectar la incorporación de BrdU en su material genético y aquellas que no lo hicieron.

El procedimiento escogido para realizar el recuento fue la discriminación entre 200 células BrdU positivas y negativas en el caso de las espermatogonias A indiferenciadas y 100 células BrdU positivas y negativas en el caso de las espermatogonias A diferenciadas. La diferente elección del número de células para estos dos diferentes estados desarrollo se basa en el hecho de que el número de espermatogonias A indiferenciadas era, normalmente, mayor del doble del número de espermatogonias A diferenciadas, siendo éste, en la mayoría de los casos cercano a 100.

Cuantificación del área testicular

Para poder medir el área de las secciones realizadas para cada uno de los ejemplares se utilizó una lupa Zeiss Stemi SV 11, una cámara digital Nikon DXM1200 y el paquete de software Nikon ACT-1, versión 2.63 (Nikon Corporation 2000), con este equipo se consiguió tomar imágenes de cada una de las secciones que fueron utilizadas en los recuentos. La elección de la lupa, y no un microscopio convencional, se debe a que ésta nos permitía obtener imágenes ampliadas y completas de las secciones gracias a que el aumento conseguido no es excesivamente grande, como ocurre con un microscopio, haciendo mucho más sencilla la aplicación de un sistema informático, que en este caso fue ImageJ, con el cual se ofrece la posibilidad de dibujar el perímetro de las secciones de los testículos y calcular, estableciendo previamente una escala, el área real de estas secciones.

Expresión de genes

Extracción de ARN

El Trizol (Invitrogen) se utilizó para extraer el ARN total del testículo. Para ello, las muestras se homogeneizaron, mecánicamente, y por cada mililitro de Trizol se añadieron 200 µl de cloroformo (Sigma) y se centrifugaron a 11.500 rpm durante 15 minutos a 4 °C. De esta forma se obtuvo una fase superior acuosa que contiene el ARN que fue transferida a unos tubos eppendorf a los que se les añadió la misma cantidad de etanol al 70% frío, que la que se recogió de fase acuosa. Se transfirió el contenido de los tubos a las columnas del ARN mini kit (Invitrogen). Éstas se centrifugaron durante 15 segundos a 11.500 rpm y se desechó el sobrenadante. Después se añadieron 700 µl de tampón de lavado I (Invitrogen), se volvió a centrifugar durante 15 segundos a la misma velocidad y de nuevo se eliminó el sobrenadante. A continuación se añadieron 500 µl de tampón de lavado II (Invitrogen) y se centrifugaron las columnas, primero durante 15 segundos y luego durante 1 minuto. Se repitió este último paso y se desechó la parte inferior de la columna conservando el tubo con el filtro. Por último se adicionaron 35 µl de agua tratada con dietilpirocabonato (DEPC) a cada tubo y se centrifugaron durante 2 minutos a 11.500 rpm.

La concentración de ARN obtenido fue cuantificada mediante absorbancia. El índice de contaminación con proteínas (Abs 260/Abs 280) se mantuvo siempre entre 2-1'5.

Obtención de ADN copia

Para eliminar posibles contaminaciones de ADN genómico, las muestras (1 µg de ARN) se completaron hasta un volumen de 8 µl con agua DEPC y fueron tratadas con 1 µl de tampón de DNasa I y 1

µl de DNasa I (Invitrogen) a 35 °C durante 15 minutos siendo la enzima posteriormente desnaturalizada al aumentar la temperatura a 65 °C durante 10 minutos en presencia de 1 µl de EDTA. La reacción de retrotranscripción fue realizada con 1 µg de ARN al que se le añadió 1 µl de Oligo-dT (Invitrogen) y 1 µl de una solución de dNTP (10 mM, Invitrogen) y se incubaron a 65 °C durante 5 minutos. Por último se adicionaron 4 µl de tampón de reacción 5x (First Strand), 1 µl de ditiotreitól (DTT) 0,1 M, 1 µl del inhibidor de RNasas (RNase Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen) y 1 µl de retrotranscriptasa (SuperScrip III RNase H-Reverse Retrotranscriptase, Invitrogen). Para llevar a cabo la reacción de síntesis del ADNc se pusieron los tubos en el termociclador a 50 °C durante 50 minutos para permitir la retrotranscripción y a 70°C durante 15 minutos para inactivar el enzima. El ADNc así obtenido fue llevado hasta un volumen final de 100 µl con agua para biología molecular (libre de RNasas y DNasas) y guardado a -20 °C.

PCR

Una vez realizada la RT se pasó a amplificar los genes: scyp3l (marcador de espermatocitos), shippo (marcador de espermátidas) y Ins13 (marcador de células de Leydig) y el control endógeno, β-actina, por PCR en un termociclador Eppendorf Mastercycle Gradient Instrument. Para analizar la expresión de cada uno de los genes, arriba indicados, se llevaron a cabo reacciones en las que se utilizaron 1 µl de ADNc junto a 2´5 µl de tampón 10x libre de Mg²⁺ (Invitrogen), 1´25 µl de MgCl₂ y de DMSO, 0´5 µl de una solución de dNTP (Invitrogen) 2´5 mM, 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos sintéticos de los genes arriba indicados, 0´1 µl de Taq ADN Polimerasa (Invitrogen) y 16´4 µl de agua para biología molecular (en cada tubo). Estas mezclas fueron incubadas a las temperaturas y tiempos que se indican

en la Tabla 1. Lamentablemente no podemos ofrecer la secuencia de los oligonucleótidos utilizados ya que todavía no están publicados y nos han sido proporcionados por la colaboración establecida con el grupo de investigación de la Universidad de Utrecht. Los productos amplificados fueron separados mediante una electroforesis en un gel de agarosa (Pro-nadisa) al 1% conteniendo 0´5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma) y visualizados con luz UV.

PCR cuantitativa a tiempo real

La PCR a tiempo real se realizó con un termociclador ABI PRISM 7500 Instrument (Applied Biosystems) usando SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems). Para el análisis de cada gen se mezcló 4´4 µl de agua para biología molecular, 0´3 µl de cada oligonucleótido sintético y 10 µl de SYBR Green, por pocillo. Entonces se añadieron 5 µl por pocillo de cDNA preparado en la siguiente proporción: 1 µl de ADNc: 4 µl de agua para biología molecular y se incubó durante 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos repetidos (15 segundos a 95 °C, 1 minuto a 60 °C y 15 segundos a 95°C). En cada caso los niveles de ARNm fueron corregidos usando como referencia endógena la expresión de ARNm de la proteína ribosómica S18 (rps18) de cada muestra y cada muestra se analizó por triplicado.

Análisis estadístico

Teniendo en cuenta de que aunque se partió de diez ejemplares para cada tratamiento el proceso llevado a cabo suele arrastrar consigo la pérdida de varios de los ejemplares, el número final de ejemplares con el que se trabajó estadísticamente fue siempre menor que 10 en todos los datos procesados.

La opción estadística que se empleó para analizar cuantitativamente los resultados obtenidos fue el paquete informático Prism 5 (GraphPad, San Diego, Ca, USA).

Todos los datos fueron analizados mediante análisis no paramétrico a través del análisis univariable de la varianza (ANOVA) y el test Tukey ($P \leq 0,05$) para determinar diferencias significativas entre los grupos. Para todos los análisis elegimos siempre un valor de significancia de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estrógenos están implicados en numerosos procesos de la reproducción masculina y son esenciales para obtener una fertilidad normal como se ha comprobado en mamíferos utilizando ratones mutados para los REs (Akingbemi y col., 2003; Gould y col., 2007). Funcionalmente, los estrógenos estimulan la renovación de las células madre de las espermatogonias en el testículo inmaduro de la anguila japonesa, probablemente, a través de las células de Sertoli (Miura y col., 1999, 2003). En los anfibios, que tienen una estructura quística similar a la de los peces, los estrógenos promueven la proliferación de las espermatogonias (Cobellis y col., 1999; Chieffi y col., 2000). Diferentes estudios han puesto de manifiesto los efectos que provocan los estrógenos en los diferentes niveles del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Tsay y col., 2005; Zhang y col., 2008) entre los que se incluyen la inhibición de la síntesis de andrógenos, actuando directamente sobre las células de Leydig (Baron y col., 2005) o sobre la hipófisis y/o el hipotálamo actuando sobre la síntesis o el control de las GTHs (Kobayashi y col., 2001), y que conduce a una interrupción de la espermatogénesis (Pawlowski y col., 2004). Sin embargo no se conoce con exactitud cuales son los niveles de actuación de los estrógenos sobre la espermatogénesis de peces y, posiblemente, un análisis morfológico detallado de los distintos tipos celulares que constituyen el testículo será de gran utilidad. Otra de las aplicaciones de nues-

tro estudio es el de prever el efecto de los contaminantes ambientales de carácter estrogénico sobre la fisiología testicular o sobre cualquier otro aspecto de la biología de los peces (Song y Gutzeit, 2003; Cabas y col., 2011, 2012). Por otra parte se ha comprobado que el E_2 inhibe la apoptosis de las espermatogonias en el testículo de tiburón (Betka y Callard, 1998) mientras que la aumenta en dorada (Chaves-Pozo y col., 2007).

Los andrógenos inducen una proliferación rápida de las espermatogonias y su diferenciación terminal en espermatozoides en testículo inmaduro de anguila japonesa en cultivo (Miura y col., 1991). El tratamiento con andrógenos de peces gato macho juveniles induce el crecimiento del testículo, la proliferación de las espermatogonias y la entrada en la meiosis (Cavaco y col., 1998) y el incremento de los niveles plasmáticos de andrógenos en el salmón coincidiendo con una proliferación rápida de las espermatogonias (Campbell y col., 2003). Sin embargo no tenemos mucha información sobre el efecto de los andrógenos en la espermatogénesis de peces adultos o sexualmente maduros.

Por tanto nuestro estudio se ha centrado en el análisis del efecto de estrógenos y andrógenos sobre la espermatogénesis de pez cebra adulto con el fin de determinar el momento preciso en el que se inhibe la espermatogénesis.

El 17β -estradiol disminuye el índice gonadosomático

El IGS es la relación existente entre el peso de la gónada y el peso corporal de un individuo. El E_2 provoca la disminución del IGS (0.3%) que tiende a volver a valores similares al IGS de los ejemplares control (1%) cuando son tratados con OA (0.7%) (Figura 7). Sin embargo el E_2 no

provocó descenso en el IGS de peces cebra aunque si provocó un descenso del peso testicular (de Waal y col., 2009), posiblemente puede ser debido a la diferente edad de los ejemplares ya que también se ha comprobado que la capacidad de respuesta de los ejemplares a los tratamientos hormonales depende de su estado de maduración (Schulz y col., 2008).

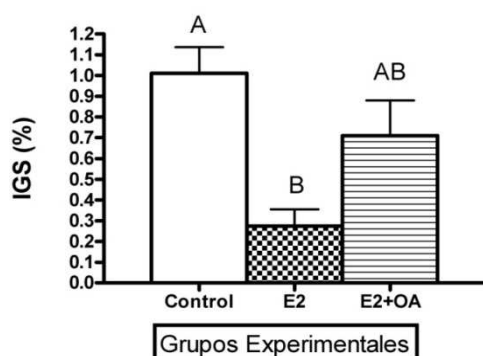


Figura 7. Índice gonadosomático de los ejemplares de pez cebra control y de los tratados con E₂ durante 5 semanas (E2) y los tratados con E₂ durante 5 semanas y con OA durante las últimas 2 semanas (E2+OA). Las diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos según el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

En consonancia con nuestros resultados, la exposición de ejemplares sexualmente maduros de dorada a dosis suprafisiológicas de E₂ durante 5 semanas provocó una disminución del IGS (Chaves-Pozo y col., 2007). Cuando los ejemplares de pez cebra son tratados con OA (precursor de la 11-KT) después y durante el tratamiento con E₂, el valor del IGS tiende a recuperar valores similares a los ejemplares control lo que concuerda con el hecho de que el E₂ provoca un descenso de los niveles plasmáticos de 11-KT (de Waal y col., 2009). Un resultado similar se ha obtenido en ratas al utilizar benzoato de estradiol (derivado sintético de E₂) y FSH (hormona necesaria para producir un incremento en los niveles de andrógenos) (Kula y col., 2001).

El 17β-estradiol provoca un aumento del número y porcentaje de quistes de espermatogonias A indiferenciadas y un descenso del resto de quistes. Los andrógenos tienen un efecto contrario

Los peces, en general, y el pez cebra, en particular, son considerados modelos excelentes para el estudio de los mecanismos de regulación de la espermatogénesis. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre la biología de la reproducción de los machos de pez cebra están centrados en determinar el efecto de los disruptores endocrinos (Nash y col., 2004; McGonnell y Fowkes, 2006) o la producción de feromonas reproductivas (Van den Hurk y col., 1987) y son muy pocos los datos cuantitativos que tenemos sobre aspectos morfológicos del testículo y la espermatogénesis (Leal y col., 2009). Por otra parte se ha demostrado que los estudios histológicos y morfométricos sobre el testículo son adecuados para el análisis de la espermatogénesis y la función testicular en peces (Vilela y col., 2003; Schulz y col., 2005).

El análisis de la frecuencia de los quistes de los diferentes tipos de células germinales lo hemos realizado sobre secciones de testículo teñidas con azul de toluidina de los ejemplares de pez cebra sometidos a los diferentes tratamientos (Figura 8). El estudio morfológico clásico de las secciones testiculares nos permite analizar el efecto del tratamiento de peces cebra adultos con E₂ y con E₂ junto con OA sobre el número y/o porcentaje de los distintos tipos de quistes. Así comprobamos que el testículo de los ejemplares de pez cebra control presenta quistes de todos los tipos de células germinales y gran cantidad de espermatozoides en la luz de los túbulos seminíferos (Figura 8a).

El tratamiento con E_2 durante 5 semanas de ejemplares adultos de pez cebra provoca modificaciones estructurales en el testículo observándose un número grande, en proporción, de quistes de espermatogonias tipo A y una reducción drástica de los espermatozoides (Figura 8b). El tratamiento con OA y E_2 durante 2 semanas tras el tratamiento con E_2 durante 3 semanas provoca la presencia, en las secciones de testículo, de gran cantidad de quistes de espermatogonias y de espermatoцитos pero menor cantidad de quistes de espermátidas y espermatozoides (Figura 8c), si se compara con las secciones testiculares de los peces cebra control (Figura 8a).

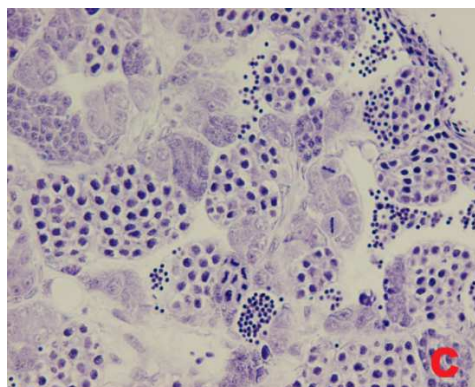
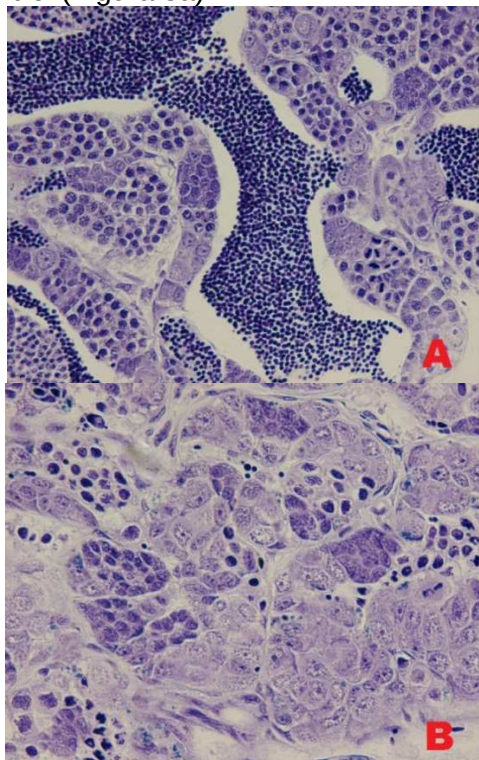


Figura 8. Secciones de testículo de pez cebra teñidas con azul de toluidina. Nótese las diferencias morfológicas entre las secciones de testículo de ejemplares de peces cebra control (A), peces cebra tratados con E_2 (B) y peces cebra tratados con E_2 y OA (C). Aind, espermatogonias A indiferenciadas; A diff, espermatogonias A diferenciadas; B, espermatogonias B; SC, espermatoцитos; ST, espermátidas; esperma, espermatozoides. Aumentos de x40

Estas diferencias morfológicas las hemos analizado con más detalle contando el número de quistes de los diferentes tipos celulares germinales y las hemos representado utilizando diferentes parámetros (número, porcentaje y número y porcentaje por área testicular) lo que nos ha permitido tener una idea más exacta y completa del efecto del tratamiento de los ejemplares de pez cebra con E_2 y con E_2 seguido de E_2 y OA.

En primer lugar hemos representado el número de quistes de células germinales (Figura 9) y hemos comprobado que en los ejemplares control hay un mayor número de quistes de espermatoцитos (~190 quistes) seguido de quistes de espermatogonias B (~100 quistes) y de espermatogonias A indiferenciadas (~90 quistes) siendo los más escasos los quistes de espermátidas (~30 quistes) aunque sin que haya un predominio excesivo de ninguno de ellos.

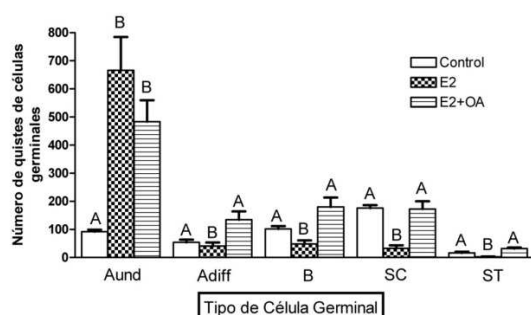


Figura 9. Número de quistes de los diferentes tipos de células germinales, en valores absolutos, en el testículo en los ejemplares de pez cebra tras los diferentes tratamientos: ejemplares control, ejemplares tratados con E₂ durante 5 semanas (E₂) y ejemplares tratados con E₂ durante 5 semanas y con OA durante las 2 últimas semanas (E₂+OA). Aund, espermatogonias A indiferenciadas; A diff, espermatogonias A diferenciadas; B, espermatogonias B; SC, espermatocitos; ST, espermatídas. Las diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos según el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

El E₂ provoca un aumento considerable del número de quistes de espermatogonias A indiferenciadas (~650 quistes frente a los ~150 quistes presentes en el testículo de los peces cebra control) y una disminución en el número de quistes de los restantes tipos celulares germinales (Figura 9) lo que hace que haya un claro predominio de espermatogonias tipo A. El tratamiento con OA y E₂, posterior al tratamiento con E₂, tiende a disminuir el número de quistes de espermatogonias A indiferenciadas (~450 quistes) aunque este número no es estadísticamente significativo con respecto al número de quistes del testículo de los ejemplares tratados sólo con E₂, y provoca que el número de quistes de los diferentes tipos de células germinales vuelva a valores similares a los encontrados en los peces cebra control (Figura 9) por lo que volvemos a encontrar secciones testiculares con todos los tipos celulares germinales, incluidos los espermatozoides.

Analizamos también el porcentaje de quistes de células germinales en el testículo de los peces cebra sometidos a los diferentes tratamientos hormonales (Figura 10) y los datos obtenidos apoyan los resultados obtenidos tras el análisis del número de quistes de células germinales.

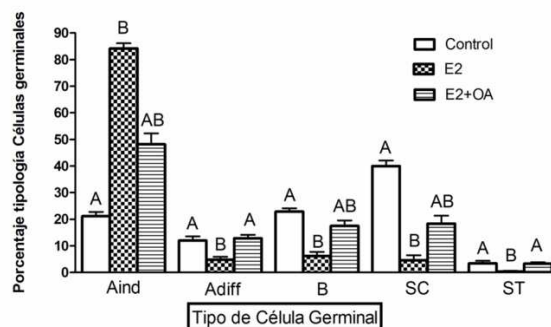


Figura 10. Porcentaje de quistes de los diferentes tipos de células germinales en el testículo de los ejemplares de pez cebra tras los diferentes tratamientos: ejemplares control, ejemplares tratados con E₂ durante 5 semanas (E₂) y ejemplares tratados con E₂ durante 5 semanas y con OA durante las 2 últimas semanas (E₂+OA). Aund, espermatogonias A indiferenciadas; A diff, espermatogonias A diferenciadas; B, espermatogonias B; SC, espermatocitos; ST, espermatídas. Las diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos según el test de Tukey ($p \leq 0,05$).

Así, en los ejemplares de pez cebra control, el quiste celular más abundante es el formado por espermatocitos (40%), seguido por el de las espermatogonias A indiferenciadas y el de las espermatogonias B (20%) y el de las espermatogonias A diferenciadas (10%) siendo los más escasos los constituidos por espermatídas (7%). El E₂ provoca un aumento en el porcentaje de los quistes de espermatogonias A indiferenciadas (84%) sobre el encontrado en los ejemplares control (20%) y una disminución en el porcentaje de quistes formados por el resto de tipos celulares germinales (Figura 9). Cuando los ejemplares han sido tratados con OA y E₂ tras el tratamiento con E₂, los porcentajes de quistes de todos los tipos celulares germinales vuelven a valores similares a los de los ejemplares control.

Las figuras 9 y 10 nos proporcionan una idea general de los valores absolutos y relativos, respectivamente, en cuanto al número de quistes de cada tipo celular germinal que encontramos en los machos de pez cebra tratados con E₂, E₂+OA y los del grupo control y que corroboran lo descrito tras las observaciones morfológicas clásicas (Figura 8). Ahora bien, estos datos no tienen en cuenta las diferencias derivadas del distinto tamaño que presentan los testículos de los ejemplares en los tres grupos estudiados, como hemos podido apreciar tras el análisis del IGS de los ejemplares de pez cebra sometidos a los diferentes tratamientos.

Por ello a continuación introdujimos un parámetro corrector de las posibles diferencias que surgen al comparar testículos de ejemplares sometidos a los diferentes tratamientos (Figura 11). Así hemos analizado el número de quistes de células germinales/área en cada una de las secciones.

Tras el análisis del número de quistes de células germinales por área se comprueba que son los quistes de espermatocitos los más abundantes en los peces cebra control (~175 quistes/mm²) seguidos por los de espermatogonias A indiferenciadas y los de espermatogonias B (~100 quistes/mm²) y por los quistes de espermatogonias A diferenciadas (~50 quistes/mm²) siendo los más escasos los de espermatidas (~16 quistes/mm²) (Figura 11). Como en los análisis anteriores comprobamos que el E₂ provoca un aumento en el número de quistes de espermatogonias A indiferenciadas (~650 quistes/mm²) mientras que el descenso en el número de quistes formados por otros tipos de células germinales, sólo es estadísticamente significativo en el caso de los quistes de espermatocitos. Además, el tratamiento con OA más E₂ no provoca una disminución estadísticamente signifi-

cativa (~500 quistes/mm²) en el número de quistes de espermatogonias A indiferenciadas mientras que si se recupera el valor de los ejemplares control en el caso del número de quistes de espermatocitos (Figura 11).

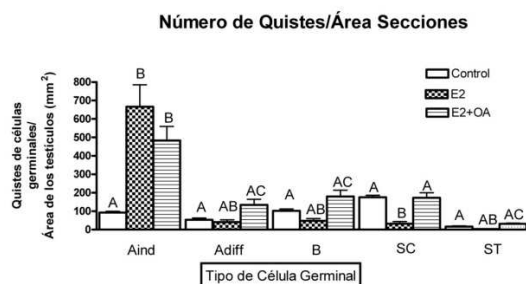


Figura 11. Número de quistes de los diferentes tipos de células germinales en el testículo en los ejemplares de pez cebra tras los diferentes tratamientos: ejemplares control, ejemplares tratados con E₂ durante 5 semanas (E₂) y ejemplares tratados con E₂ durante 5 semanas y con OA durante las 2 últimas semanas (E₂+OA). Aind, espermatogonias A indiferenciadas; A diff, espermatogonias A diferenciadas; B, espermatogonias B; SC, espermatocitos; ST, espermatidas. Las diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos según el test de Tukey (p≤0,05).

Todos estos datos nos apuntan que el E₂ promueve la proliferación celular de la espermatogonias A indiferenciadas al producir un incremento importante en su número y porcentaje en los ejemplares macho adultos de pez cebra pero imposibilita que éstas se diferencien a espermatogonias A diferenciadas por lo que se reduce el número de todos los tipos celulares germinales restantes de la espermatogénesis incluidos los espermatozoides. Sin embargo, el tratamiento con dosis suprafisiológicas de E₂ en machos funcionales de dorada, una especie hermafrodita protándrica, acelera los eventos finales de la espermatogénesis, es decir se produce un número importante de espermatozoides que, sin embargo, no son liberados al medio marino e inhibe la proliferación de las espermatogonias en los estadios más tempranos (Chaves-Pozo y col., 2007). Teniendo en cuenta el incremento en la

ratio de renovación de las espermatogonias tipo A podría pensarse que la ratio de apoptosis, al menos en las espermatogonias tipo A, podría no verse afectada. Futuros estudios serían interesantes para determinar la influencia o no del E_2 en la pérdida de espermatogonias tipo A mediante apoptosis.

El tratamiento con OA favorece la diferenciación de las espermatogonias A indiferenciadas en espermatogonias A diferenciadas ya que hay una ligera disminución de las espermatogonias A indiferenciadas y un aumento de los restantes tipos celulares germinales conducentes a la formación de espermatozoides.

En diferentes estudios en los que se ha combinado el tratamiento de estrógenos con andrógenos o con hormonas hipotalámicas o hipofisarias se ha comprobado que las células que se generan por renovación de las espermatogonias en presencia de E_2 son capaces posteriormente, cuando se suministraba 11-KT, de proliferar y de diferenciarse para dar lugar a todos los demás tipos celulares de células espermatogénicas, indicando que estas nuevas espermatogonias guardan la habilidad de desarrollarse hasta espermatozoides (Miura y col., 1999; Kula y col., 2001). Además, Agulleiro y col. (2007) observaron que en los ejemplares macho de lenguado senegalés tratados con OA y análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH α) se producía un aumento alto de la concentración plasmática de 11-KT y una mayor proporción de espermátidas por sección de testículo indicando que este tratamiento aceleraba el proceso de espermatogénesis con respecto al tratamiento del lenguado senegalés únicamente con GnRH α .

Leal y col. (2009) han determinado que en pez cebra se necesitan seis días para que se lleve a cabo de forma comple-

ta las fases meiótica y espermiogénica pero no se han realizado estudios que determinen el tiempo necesario para que una espermatogonia tipo A indiferenciada proliferare y se diferencie hasta alcanzar el estado de preleptotene. De nuestros resultados podemos, también, concluir que el tratamiento de los ejemplares de pez cebra con OA y E_2 durante dos semanas, tras haber sido tratados con E_2 durante 3 semanas, no es tiempo suficiente para que el número y porcentaje de la espermatogonias A indiferenciadas vuelva a valores similares a los de los ejemplares de pez cebra control y permita que la espermatogénesis progrese adecuadamente y, que por lo tanto, el tiempo necesario para que una espermatogonia A indiferenciada llegue a dar lugar a un quiste de células en preleptotene es mayor a dos semanas (Miura y col., 1991; Leal y col., 2009). Nuevos experimentos en los que se traten ejemplares de pez cebra con OA durante un periodo de tiempo mayor permitirán comprobar el tiempo necesario para que una espermatogonia A indiferenciada complete la espermatogénesis. También sería interesante comprobar si OA únicamente tiene capacidad proliferativa y si no permite que se lleve a cabo la autorrenovación, de tal manera que sería adecuado tratar a un grupo de individuos de pez cebra con OA durante un periodo de tiempo determinado y comprobar si el número de espermatogonias A indiferenciadas disminuye, lo que indicaría que efectivamente, OA permite la proliferación pero no la diferenciación.

El 17β -estradiol y los andrógenos inducen un aumento del número y porcentaje de espermatogonias A indiferenciadas

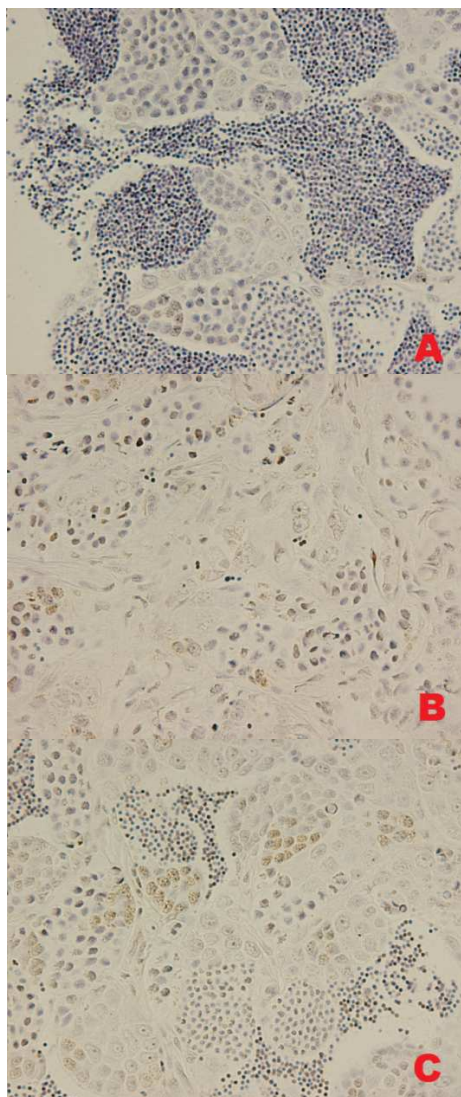


Figura 12.- Secciones testiculares de ejemplares de pez cebra control (A), de ejemplares tratados con E₂ durante 3 semanas (B) y de ejemplares tratados con E₂ durante 5 semanas y tratados con OA durante las 2 últimas semanas (C) que han sido inmunotñidas con el suero anti-BrdU. Los ejemplares han sido previamente incubados con BrdU. Nótese como el número de células BrdU positivas es mayor en las figuras B y C. Aumentos de x40.

Para determinar el efecto de estrógenos y andrógenos sobre la proliferación celular realizamos una técnica inmunocitoquímica utilizando un suero anti-BrdU para lo que previamente los ejemplares de pez cebra han sido tratados con BrdU. En los ejemplares control no observamos un número importante de células BrdU positi-

vas (Figura 12a) mientras que tanto en los ejemplares de pez cebra tratados con E₂ (Figura 12 b) como los tratados con E₂ más OA (Figura 12c) se produce un aumento en el número de células BrdU positivas.

Comprobamos que el E₂ inhibe la espermatogénesis ya que se produce un aumento de la proliferación celular de las espermatogonias A indiferenciadas pero no la de las espermatogonias A diferenciadas.

A continuación analizamos el número de espermatogonias A indiferenciadas (Figura 13a) y espermatogonias A diferenciadas (Figura 13b) que han incorporado BrdU y, que por tanto, se encuentran en fase de proliferación celular.

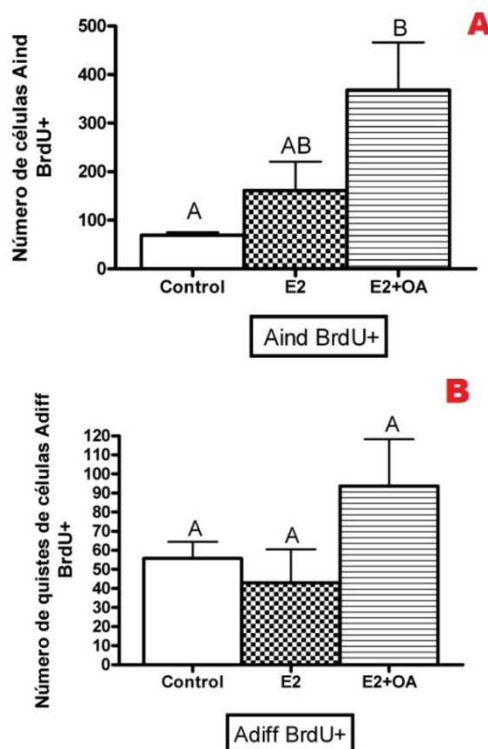


Figura 13.- Número de espermatogonias A indiferenciadas BrdU positivas (a) y de espermatogonias A diferenciadas BrdU positivas (b) en las secciones testiculares de ejemplares de peces cebra control, tratados con E₂ durante 3 semanas (E₂) y tratados con E₂ durante 5 semanas y de OA durante las 2 últimas semanas (E₂+OA). Aind BrdU+, espermatogonias A indiferenciadas que han incorporado BrdU en su material genético y que han sido pues-

tas de manifiesto mediante un suero anti-BrdU mediante una técnica inmunocitoquímica.

El E₂ induce la proliferación de las espermatogonias A indiferenciadas pero no la de las espermatogonias A diferenciadas. El tratamiento con OA mantiene el número de espermatogonias A indiferenciadas en proliferación (Figura 13a) y no induce la proliferación de las espermatogonias A diferenciadas (Figura 13b).

Cuando analizamos el porcentaje de células BrdU positivas (Figura 14) observamos resultados similares a los descritos anteriormente. El E₂ y el OA aumentan el porcentaje de espermatogonias A indiferenciadas BrdU positivas.

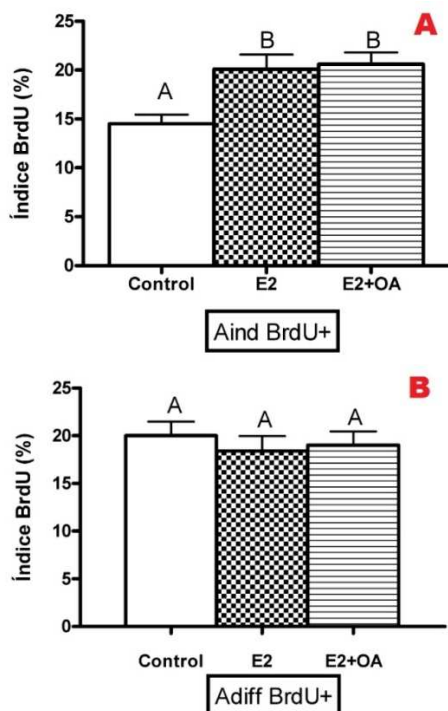


Figura 14.- Porcentaje de espermatogonias A indiferenciadas BrdU positivas (a) y de espermatogonias A diferenciadas BrdU positivas (b) en las secciones testiculares de ejemplares de peces cebra control, tratados con E₂ durante 3 semanas (E2) y tratados con E₂ durante 5 semanas y de OA durante las 2 últimas semanas (E2+OA). Aind BrdU+, espermatogonias A indiferenciadas que han incorporado BrdU en su material genético y que han sido puestas de manifiesto mediante un suero anti-BrdU mediante una técnica inmunocitoquímica.

De forma similar a como hicimos con el número de quistes de células germinales hemos analizado el número y de espermatogonias tipo A BrdU positivas por área de la sección testicular (Figura 15). Los resultados son similares a los descritos anteriormente.

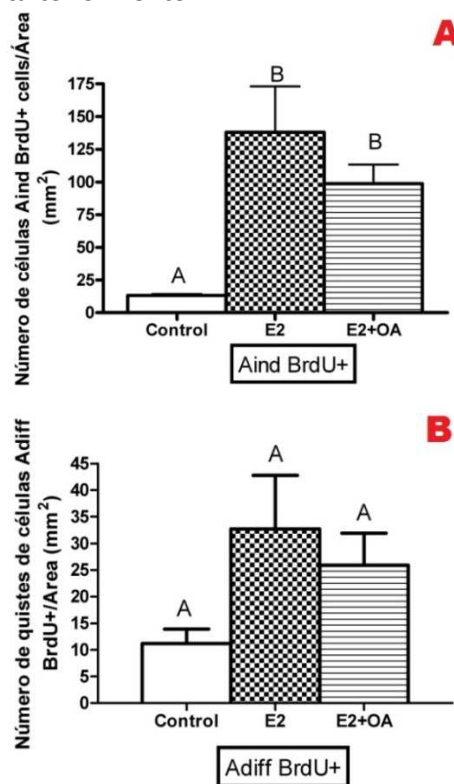


Figura 15.- Número de espermatogonias A indiferenciadas BrdU positivas/mm² (a) y de espermatogonias A diferenciadas BrdU positivas/mm² (b) en las secciones testiculares de ejemplares de peces cebra control, tratados con E₂ durante 3 semanas (E2) y tratados con E₂ durante 5 semanas y de OA durante las 2 últimas semanas (E2+OA). Aind BrdU+, espermatogonias A indiferenciadas que han incorporado BrdU en su material genético y que han sido puestas de manifiesto mediante un suero anti-BrdU mediante una técnica inmunocitoquímica.

Los andrógenos inducen la expresión de genes marcadores de diferentes tipos celulares testiculares.

Hemos analizado los niveles de expresión génica de tres genes involucrados en la espermatogénesis (Figura 16): *sycp3*, *shippo 1* e *insl3*.

Sycp3 es una proteína específica de la meiosis que forma parte de la familia de proteínas del complejo sinaptonémico que han sido caracterizadas en mamíferos, especialmente en roedores (Baier y col., 2007). Recientemente Iwai y col. (2004, 2006) han descrito que *Sycp3* se expresa durante la meiosis de medaka y por tanto este gen puede ser utilizado como marcador de espermatocitos.

Shippo 1 es un gen marcador de células haploides es decir de espermátidas y espermatozoides que fue clonado y caracterizado en testículo de ratón (Egydio de Carvalho y col., 2002). *Shippo 1* es una proteína que está presente en el citoplasma de las espermátidas y en la cola de los espermatozoides maduros.

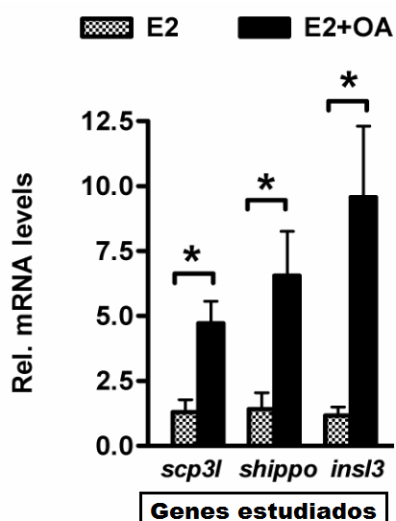


Figura 16.- Análisis de los niveles de ARNm de *scp3l*, *shippo* y *insl3* en testículo de ejemplares de pez cebra tratados con E_2 durante 5 semanas (E_2) y ejemplares tratados con E_2 durante 5 semanas y con OA durante las 2 últimas semanas (E_2+OA) mediante qRT-PCR. Los datos de expresión representan la media $\pm$ SEM de muestras por triplicado. Los niveles de expresión del gen fueron normalizados con los niveles de ARNm de *rps18*. Las diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos según el test de Tukey ($p \leq 0,05$). El ARNm total se obtuvo realizando un pool con la misma cantidad de ARNm de 6 peces/grupo/tiempo.

La proteína *insl3*, factor similar a insulina 3, fue denominada inicialmente como péptido similar a Leydig (Ley-I-L) y tam-

bién es conocida como factor similar a relaxina (RLF) y es un miembro de la familia de la relaxina. Su función principal está asociada al descenso del testículo (Nef y Parada, 1999; Zimmermann y col., 1999). La *Ins13*, como la testosterona, es producida por las células de Leydig y es, por tanto, considerada como un marcador de las células de Leydig (Foresta y col., 2004).

El perfil de expresión de los tres genes es bajo en los ejemplares tratados con E_2 lo que concuerda con el descenso en el número y porcentaje de los espermatocitos y espermátidas. Por otra parte, también es bajo el perfil de expresión de *insl3* lo que nos sugiere que el E_2 también provoca un descenso en el número y/o en la actividad de las células de Leydig. Por otra parte, el tratamiento posterior con OA provoca un aumento importante en la expresión de los tres genes.

CONCLUSIONES

1. El 17β -estradiol inhibe la progresión de la espermatogénesis en ejemplares macho de pez cebra sexualmente maduros ya que provoca un aumento en el número y porcentaje de espermatogonias A indiferenciadas como consecuencia de un aumento en su ratio de proliferación celular y disminuye el número y porcentaje de espermatogonias A diferenciadas, espermatogonias B, espermatozoides y, por tanto, de espermatozoides ya que no estimula la ratio de proliferación celular de las espermatogonias A diferenciadas.

2. Los andrógenos, por el contrario, no inhiben la progresión de la espermatogénesis en ejemplares macho de pez cebra sexualmente maduros ya que no aumenta el número y porcentaje de espermatogonias A indiferenciadas ni su ratio de proliferación celular pero sí aumenta el número y porcentaje de espermatogonias

A diferenciadas, espermatogonias B, espermatoцитos, espermátidas y, por tanto, de espermazoides aunque no se estimula la ratio de proliferación celular de las espermatogonias A diferenciadas.

3. Los andrógenos estimulan la expresión de genes marcadores de espermatoцитos, espermátidas y espermatozoides y de células de Leydig.

BIBLIOGRAFÍA

- AGULLEIRO, M.J.; SCOTT, A.P.; DUNCAN, N.; CONSTANTINOS, C.M. & CERDÀ, J. (2007). Treatment of GnRHa-implanted Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with 11-ketoandrostenedione stimulates spermatogenesis and increases sperm motility. *Comp. Biochem. Physiol.* 147, 885-892.
- AHERNE, G.W. & BRIGGS, R. (1989). The relevance of the presence of certain synthetic steroids in the aquatic environment. *J. Pharm. Pharmacol.* 41, 735-736.
- AKINGBEMI, B.T.; GE, R.; ROSENFELD, C.S.; NEWTON, L.G.; HARDY, D.O.; CATTERALL, J.F.; LUBAHN, D.B.; KORACH, K.S. & HARDY, M.P. (2003). Estrogen receptor- α gene deficiency enhances androgen biosynthesis in the mouse Leydig cell. *Endocrinol.* 144, 84-93.
- ALMEIDA, F.F.L.; KRISTOFFERSEN, C.; TARANGER, G.L. & SCHULZ, R.W. (2008). Spermatogenesis in Atlantic cod (*Gadus morhua*): A novel model of cystic germ cell development. *Biol. Reprod.* 78, 27-34.
- ALSOP, D.; MATSUMOTO, J.; BROWN, S. & VAN DER KRAAK, G. (2008). Retinoid requirements in the reproduction of zebrafish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156, 51-62.
- AMER, M.A.; MIURA, T.; MIURA, C. & YAMAUCHI, K. (2001). Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen (*Hucho perryi*). *Biol. Reprod.* 65, 1057-1066.
- ANDERSEN, L.; HOLBECH, H.; GESSBO, A.; NORRGREN, L. & PETERSEN, G.I. (2003). Effects of exposure to 17 α -ethynylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol.* 134, 365-374.
- ANDO, N.; MIURA, T.; MIURA, C. & YAMAUCHI, K. (2000). A method for estimating the number of mitotic divisions in fish testes. *Fish. Sci.* 66, 299-303.
- ARENAS, M.I.; FRAILE, B.; DE MIGUEL, M.P. & PANIAGUA, R. (1995). Cytoskeleton in Sertoli cells of the mosquito fish (*Gambusia affinis holbrooki*). *Anat. Rec.* 24, 225-234.
- BAIER, A.; ALSHEIMER, M. & BENAVENTE, R. (2007). Synaptonemal complex protein SYCP3: Conserved polymerization properties among vertebrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1774, 595-602.
- BALCH, G.C.; MACKENZIE, C.A. & METCALFE, C.D. (2004). Alterations to gonadal development and reproductive success in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 α -ethynylestradiol. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 782-791.
- BARON, D.; FOSTIER, A.; BRETON, B. & GUINGUEN, Y. (2005). Androgen and estrogen treatments alter steady state messenger RNA (mRNA) levels of testicular steroidogenic enzymes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mol. Reprod. Develop.* 71, 471-479.
- BARR, W.A. (1963). The endocrine control of the sexual cycle in the plaice *Pleuronectes platessa* L. III. The endocrine control of spermatogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 3, 216-225.
- BENNINGTON, N.L. (1936). Germ cell origin and spermatogenesis in the Siamese fighting fish *Betta splendens*. *J. Morphol.* 60, 145-153.
- BETKA, M. & CALLARD, G.V. (1998). Negative feedback control of the spermatogenic progression by testicular oestrogen synthesis: insights from the shark testis model. *APMIS* 106, 252-257.
- BHATTI, M.N. & AL-DAHAM, N.K. (1978). Annual cyclical changes in the testicular activity of a freshwater teleost, *Barbus luteus* (Heckel) from Shatt-Al-Arab, Iraq. *J. Fish Biol.* 13, 321-326.
- BILLARD, R. (1969). La spermatogenese de *Poecilia reticulata* L. Estimation du nombre de generations goniales et rendement de la spermatogenese. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 9, 251-271.
- BILLARD, R. (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr. Develop.* 26, 877-920.
- BILLARD, R.; FOSTIER, A.; WEIL, C. & BRETON, B. (1982). Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 39, 65-79.
- BORG, B. (1994). Androgens in teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 109C, 219-245.
- BORG, B.; ANTONOPOULOU, E.; ANDERSON, E.; CARLBERG, T. & MAYER, I. (1993). Effectiveness of several androgens in stimulating kidney hypertrophy, a secondary sexual character, in castrated male three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Can. J. Zool.* 71, 2327-2329.
- BORTONE, S.A. & DAVIS, W.P. (1994). Fish intersexuality as indicator of environmental stress. *Bioscience*. 44, 165-172.
- BOUMA, J. & NAGLER, J.J. (2001). Estrogen receptor- α protein localization in the testis of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during different stages of the reproductive cycle. *Biol. Reprod.* 65, 60-65.
- CABAS, I.; CHAVES-POZO, E.; GARCÍA-ALCÁZAR, A.; ABELLÁN, E.; MESEGUER, J.; MULERO, V. & GARCÍA-AYALA, A. (2011). Dietary intake of 17 α -ethynylestradiol promotes leukocyte infiltration in males of the hermaphrodite gilthead seabream. *Mol. Immunol.* 48, 2079-2086.
- CABAS, I.; LIARTE, S.; GARCÍA-ALCÁZAR, A.; MESEGUER, J.; MULERO, V. & GARCÍA-AYALA, A. (2012). 17 α -ethynylestradiol alters the immune response of the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) both in vivo and in vitro. *Dev. Comp. Immunol.* 36, 547-556.
- CALLARD, G.V. & CALLARD, I.P. (1999). Spermatogenesis in nonmammals. En: *Encyclopedia of Reproduction*, Vol 4 (Knobil, E., Neil, J., eds.), pp. 563-570. Academic Press, New York.
- CALLARD, G.V. (1991). Spermatogenesis. En: *Vertebrate endocrinology: fundamentals and biomedical implications*, Vol 4 (Pang, P.K.T., Schreiber, M.P., eds.), pp. 303-341. Academic Press, New York.
- CALLARD, G.V. (1996). Endocrinology of Leydig cells in nonmammalian vertebrates. En: *The Leydig Cell* (Payne, A.H., Hardy, M.P., Russell, L.D., eds.), pp. 308-331. Cache River Press, Vienna, IL, USA.

- CAMPBELL, B.; DICKEY, J.T. & SWASON, P. (2003). Endocrine changes during onset of puberty in male spring Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Biol. Reprod.* 65, 60-65.
- CARRILLO, M. & ZANUY, S. (1977). Quelques observations sur le testicule chez *Spicara chrysels*. *Invest. Pesq.* 41, 121-146.
- CAVACO, J.E.B.; VILROUX, C.; TRUDEAU, V.L.; SCHULZ, R.W. & GOOS, H.J.T. (1998). Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish, *Clarias gariepinus*. *Am. J. Physiol.* 44, R1793-R1802.
- CHANG, X.T.; KOBAYASHI, T.; TODO, T.; IKEUCHI, T.; YOSHIURA, Y.; KAJIURA-KABAYASHI, H.; MORREY, C. & NAGAHAMA, Y. (1999). Molecular cloning of estrogen receptors α and β in the ovary of a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Zool. Sci.* 16, 653-658.
- CHAVES-POZO, E. (2005). Interacción inmunoreproductora en el testículo de dorada (*Sparus aurata* L.). Tesis doctoral, Universidad de Murcia.
- CHAVES-POZO, E.; LIARTE, S.; VARGAS-CHACOFF, L.; GARCÍA-LÓPEZ, A.; MULERO, V.; MESEGUER, J.; MANCERA, J.M. & GARCÍA-AYALA, A. (2007). 17 β -estradiol triggers postspawning in spermatogenically active gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) males. *Biol. Reprod.* 76, 142-148.
- CHIEFFI, P.; COLUCCI-D'AMATO, G.L.; STAIBANO, S.; FRANCO, R. & TRAMONTANO, D. (2000). Estradiol-induced mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2) activity in the frog (*Rana esculenta*) testis. *J. Endocrinol.* 167, 77-84.
- CLERMONT, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52, 198-236.
- COBELLIS, G.; PIERANTONI, R.; MINUCCI, S.; PERNAS-ALONSO, R.; MECCARIELLO, R. & FASANO, S. (1999). c-fos activity in *Rana esculenta* testis: seasonal and estradiol-induced changes. *Endocrinol.* 21, 291-306.
- DE ROOIJ, D.G. & RYSELL, L.D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.* 21, 776-798.
- DE WAAL, P.P.; LEAL, M.C.; GARCÍA-LÓPEZ, Á.; LIARTE, S.; DE JONGE, H.; FRAY, N.; BRION, F.; SCHULZ, R.W. & BOGERD, J. (2009). Oestrogen-induced androgen insufficiency results in a reduction of proliferation and differentiation of spermatogonia in the zebrafish testis. *J. Endocrinol.* 202, 287-297.
- DEPECHE, J. & SIRE, O. (1982). In vitro metabolism of progesterone and 17 α -hydroxyprogesterone in the testis of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich., at different stages of spermatogenesis. *Reprod. Nut. Develop.* 22, 427-438.
- DESBROW, C.; ROUTLEDGE, E.J.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J.P. & WALDOCK, M.J. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent: 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1559-1565.
- EGYDIO DE CARVALHO, C.; TANAKA, H.; IGUCHI, N.; VENTELÄ, S.; NOJIMA, H. & NISHIMUNE, Y. (2002). Molecular cloning and characterization of a complementary DNA encoding sperm tail protein shippo 1. *Biol. Reprod.* 66, 785-795.
- FORESTA, C.; ZUCCARELLO, D.; GAROLLA, A. & FERLIN, A. (2004). Role of hormones, genes, and environmental in human cryptorchidism. *Endocrinol. Rev.* 29, 560-580.
- FOSTIER, A.; JALABERT, B.; BILLARD, R. & BRETON, B. (1993). The gonadal steroids. En: *Fish Physiology*, Vol IX A (Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M., eds.), pp. 197-219. Academic Press, New York.
- GARCÍA-LÓPEZ, A.; BOGERD, J.; GRANNEMAN, J.C.; VAN DIJK, W.; TRANT, J.M.; TARANGER, G.L. & SCHULZ, R.W. (2008). Leydig cells express FSH receptors in African catfish. *J. Endocrinol.* 150, 357-365.
- GARCÍA-LÓPEZ, Á.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G. & SARASQUETE, C. (2005). Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): Anatomy, histology and histochemistry. *Histol. Histopathol.* 20, 1179-1189.
- GEISER, S.W. (1924). Sex ratio and spermatogenesis in the top minnow, *Gambusia holbrooki*. *Biol. Bull. Woods Hole* 47, 175-203.
- GOMEZ, J.M.; WEIL, C.; OLLITRAULT, M.; LEBAIL, P.Y.; BRETON, B. & LEGAC, 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.
- GOOS, H.J.T. & CONSTEN, D. (2002). Stress adaptation, cortisol and pubertal development in the male common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 197, 105-116.
- GOULD, M.L.; HURST, P.R.; & NICHOLSON, H.D. (2007). The effects of oestrogen receptors α and β on testicular cell number and steroidogenic in mice. *Reprod.* 134, 271-279.
- GRIER, H.J. (1984). Testis structure and formation of spermatophores in the atherinomorph teleost *Horaichthys setnai*. *Copeia* 4, 833-839.
- GRIER, H.J. (1981). Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer. Zool.* 21, 345-357.
- GRIER, H.J.; LINTON, J.R.; LEATHERLAND, J.F. & DE VLAMING, V.L. (1980). Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Am. J. Anat.* 159, 331-345.
- HAUBRUGE, E.; PETIR, F. & GAGE, M.J.G. (2000). Reduced sperm counts in guppies (*Poecilia reticulata*) following exposure to low levels of tributyltin and bisphenol A. *Proc. Roy. Soc. London Ser. B.* 267, 2333-2337.
- HESS, R.A.; BUNICK, D. & BARR, J.M. (1995). Sperm, a source of estrogen. *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl 7), 59-62.
- HILL, R.L. & JANZ, D.M. (2003). Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*). I. Effects on sex ratio and breeding success. *Aquatic. Toxicol.* 63, 417-429.
- HOFMANN, M.C. (2008). Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol. Cell. Endocrinol.* 288, 95-103.
- HUHTANIEMI, I.T. & THEMEN, A.P. (2005). Mutations in human gonadotropin and gonadotropin receptor genes. *Endocrine* 26, 207-217.
- IDLER, D.R.; BITNERS, I.I. & SCHMIDT, P.J. (1961). 11-ketotestosterone: An androgen for sockeye salmon. *Can. J. Biochem. Physiol.* 39, 1737-1742.
- IKEUCHI, T.; TODO, T.; KOBAYASHI, T. & NAGAHAMA, Y. (2001). Two subtypes of androgen and progesterone receptors in fish testes. *Comp. Biochem. Physiol.* 129B, 449-445.
- ITO, K.; MOCHIDA, K. & FUJII, K. (2007). Molecular cloning of two estrogen receptors expressed in the testis of

- Japanese common goby. *Acanthogobius flavimanus*. Zool. Sci. 24, 986-996.
- IWAI, T.; LEE, J.; YOSHII, A.; YOKOTA, T.; MITA, K. & TAMASHITA, M. (2004). Changes in the expression and localization of cohesin subunits during meiosis in a non-mammalian vertebrate, the medaka fish. *Gene Expr. Parr.* 4, 495-504.
- IWAI, T.; YOSHII, A.; YOKOTA, T.; SAKAI, C.; HORI, H.; KANAMORI, A. & YAMASHITA, M. (2006). Structural components of the synaptonemal complex, SYCP1 and SYCP3, in the medaka fish *Oryzias latipes*. *Exp. Cell Res.* 312, 2528-2537.
- JAMIESON, B.G.M. (1991). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge University Press, Cambridge.
- JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C.R.; BRIGHTLY, G. & SUMPTER, J.P. (1998). Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498-2506.
- KAMEI, H.; KAWAZOE, I.; KANEKO, T. & AIDA, K. (2005). Purification of follicle-stimulating hormone from immature Japanese eel, *Anguilla japonica*, and its biochemical properties and steroidogenic activities. *Gen. Comp. Endocrinol.* 143, 257-266.
- KAZETO, Y.; KOHARA, M.; MIURA, T.; MIURA, C.; YAMAGUCHI, S.; TRANT, J.M.; ADACHI, S. & YAMAUCHI, K. (2008). Japanese eel follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH): production of biologically active recombinant FSH and LH by *Drosophila* S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. *Biol. Reprod.* 79, 938-946.
- KOBAYASHI, M.; AIDA, K. & STACEY, N.E. (1991). Induction of testis development by implantation of 11-ketotestosterone in female goldfish. *Zool. Sci.* 8, 389-393.
- KOBAYASHI, M.; SOHN, Y.C.; YOSHIURA, T. & AIDA, K. (2001). Effects of sex steroid on mRNA levels of gonadotropin subunits in juvenile and ovariectomized goldfish *Carassius auratus*. *Fish. Science* 66, 287-231.
- KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T., THURMAN, E.M.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.B. y col. (2002a). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202-1211.
- KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T., THURMAN, E.M.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.B. y col. (2002b). Response to comment on, "Pharmaceuticals, hormones, and other organic waste-water contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance". *Environ. Sci. Technol.* 36, 4007-4008.
- KOSTERVA, N. & HOFMANN, M.C. (2008). Regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Reprod. Domest. Anim.* 43 (Suppl. 2), 386-392.
- KOULISH, S.; KRAMER, C.R. & Grier, H.J. (2002). Organization of the male gonad in a protogynous fish *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *J. Morphol.* 254, 292-311.
- KULA, K.; WALCZAK-JEDRZEJOWSKA, R.; SLOWIKOWSKA-HILEZER, J. & OSZUKOWSKA, E. (2001). Estradiol enhances the stimulatory effect of FSH on testicular maturation and contributes to precocious initiation of spermatogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 178, 89-97.
- LAHNSTEINER, F. & PATZNER, R.A. (1990). The mode of male germ cell renewal and ultrastructure of early spermatogenesis in *Salaria (=Blennius) pavo* (Teleostei: Blenniidae). *Zool. Anz.* 224, 129-139.
- LAHNSTEINER, F.; BERGER, B.; KLETZL, M. & WEISMANN, T. (2006). Effect of the 17 β -estradiol on gamete quality and maturation in two salmonid species. *Aquat. Toxicol.* 79, 124-131.
- LANGE, R.; HUTCHINSON, T.H.; CROUDACE, C.P. & SIEGMUND, F. (2001). Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1216-1227.
- LANGE, R.; HUTCHINSON, T.H.; CROUDACE, C.P. & SIEGMUND, F. (2001). Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1216-1227.
- LARSSON, D.G.J.; ADOLFSSON-ERICI, M.; PARKKONEN, J.; PETTERSSON, M.; BERG, A.H.; OLSSON, P.E. y col. (1999). Ethinylestradiol - an undesired fish contraceptive? *Aquat. Toxicol.* 45, 91-97.
- LARSSON, D.G.J.; HÄLLMAN, H. & FÖRLIN, L. (2000). Environmental toxicology - more male fish near a pulp mill. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2911-2917.
- LEAL, M.C.; CARDOSO, E.R.; NÓBREGA, R.H.; BATLOUNI, S.R.; BOGERD, J.; FRANÇA, L.R. & SCHULZ, R.W. (2009). Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatological generations. *Biol. Reprod.* 81, 177-187.
- LEGAC, F. & LOIR, M. (1999). Male reproductive system, fish. En: *Encyclopedia of reproduction*, Vol 3 (Knobil, E., Neil, J.D., eds.), pp. 20-30. Academic Press, New York.
- LEGAC, F.; LAREYRE, J.J.; MONTFORT, J.; ESQUERRÉ, D. & HOULGATTE, R. (2008). Transcriptional analysis of spermatogenesis regulation by sex steroids in trout. *Cybiu (Suppl. 32)*, 119-121.
- LEHRIC, G.K. (1967). The annual cycle in the testis of the catfish *Clarias batrachus* L. *Acta Anat.* 67, 135-154.
- LI, L. & XIE, T. (2005). Stem cell niche: Structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 605-631.
- LOIR, M. (1999). Spermatogonia of rainbow trout: II. In vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. *Mol. Reprod. Develop.* 53, 434-442.
- LOIR, M.; SOURDAINE, P.; MENIS-HANDAGAMA, S.M.L.C. & JÉGOU, B. (1995). Cell-cell interactions in the testis of teleosts and elasmobranchs. *Microsc. Res. Techniq.* 32, 533-552.
- MATTEI, X. (1993). Peculiarities in the organization of testis of Ophidion sp. (Pisces Teleostei). Evidence for two types of spermatogenesis in teleost fish. *J. Fish Biol.* 43, 931-937.
- MAYER, I.; BORG, B. & SCHULZ, R. (1990a). Conversion of 11-ketoandrostenedione to 11-ketotestosterone by blood cells levels of six fish species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77, 70-74.
- MAYER, I.; BORG, B. & SCHULZ, R. (1990b). Seasonal changes in and effect of castration/androgen replacement on the plasma levels of five androgens in the male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 23-30.
- MCGONNELL, I.M. & FOWKES, R.C. (2006). Fishing for gene function-endocrine modeling in the zebrafish. *J. Endocrinol.* 189, 425-439.
- MENUET, A.; PELLEGRINI, E.; ANGLADE, I.; BLAISE, O.; LAUDET, V.; KAH, O. & PAKDEL, F. (2002). Molecular characterization of the three estrogen receptor form in

- zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Bio. Reprod.* 66, 1881-1892.
- METCALFE, C.D.; MERCALFE, T.L.; KIPARISSIS, Y.; KOENIG, B.G.; KHAN, C.; HUGHES, R.J. y col. (2001). Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by *in vivo* assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 297-308.
- MIURA, C.; HIGASHINO, T. & MIURA, T. (2007). A prostaglandin is an essential factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells of the eel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 7333-7338.
- MIURA, T.; MIURA, C.; KONDA, Y. & YAMAUCHI, K. (2002). Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. *Development* 129, 2689-2697.
- MIURA, T.; MIURA, C.; OHTA, T.; NADER, M.R.; TODO, T. & YAMAUCHI, K. (1999). Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 5504-5510.
- MIURA, T.; MIURA, C.; YAMAUCHI, K. & NAHAGAMA, Y. (1995). Human recombinant activin induces proliferation of spermatogonia in vitro in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish. Sci.* 61, 434-437.
- MIURA, T.; OHTA, T.; MIURA, C. & YAMAUCHI, K. (2003). Complementary deoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. *J. Endocrinol.* 144, 5504-5510.
- MIURA, T.; YAMAUCHI, K.; TAKASHABI, H. & NAHAGAMA, Y. (1991a). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 5774-5778.
- MIURA, T.; YAMAUCHI, K.; TAKASHABI, H. & NAHAGAMA, Y. (1991b). Involvement of steroid hormones in gonadotropin-induced testicular maturation in male eel (*Anguilla japonica*). *Biomed. Res.* 12, 241-248.
- MOSER, H. (1967). Seasonal histological changes in the gonads of *Sebastes paucispinis*. *J. Morphol.* 123, 329-354.
- MUÑOZ, M.; CASADEVALL, M. & BONET, S. (2002). Testicular structure and semicystic spermatogenesis in a specialized oviparous species: *Scorpaena notata* (Pisces, Scorpaenidae). *Acta Zool.* 83, 213-219.
- NAHAGAMA, Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. En: *Fish physiology*, Vol IX A (Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M, eds.), pp. 223-264. Academic Press, New York.
- NAHAGAMA, Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38, 217-229.
- NASH, J.P.; KIME, D.E.; VAN DER VEN, L.T.; WESTER, P.W.; BRION, F.; MAACK, G.; STAHLSCHEIDT-ALLNER, P. & TYLER, C.R. (2004). Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ. Health Perspect.* 112, 1725-1733.
- NASH, J.P.; KIME, D.E.; VAN DER VEN, L.T.M.; WESTER, P.W.; BRION, F.; MAACK, G.; STAHLSCHEIDT-ALLNER, P. & TYLER, C.R. (2004). Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethinylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ. Health Persp.* 112 (7), 1725-1733.
- NEF, S. & PARADA, L.F. (1999). Cryptorchidism in mice mutant for *Ins13*. *Nat. Genet.* 22, 295-299.
- NÓBREGA, R.H.; BATLOUNI, S.R. & FRANÇA, L.R. (2009). An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 197-206.
- OATLEY, J.M. & BRINSTER, R.L. (2008). Regulation of spermatogonial stem cell selfrenewal in mammals. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 24, 263-286.
- OHTA, T.; MIYAKE, H.; MIURA, C.; KAMEI, H.; AIDA, K. & MIURA, T. (2007). Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biol. Reprod.* 77, 970-977.
- PATZNER, R.A. & SEIWALD, M. (1987). The reproduction of *Blennius pavo* (Teleostei, Blenniidae). VI. Testicular cycle. *Zool. Anz.* 219, 265-273.
- PAWLOWSKI, S.; VAN AERLE, R.; TYLER, C.R. & BRAUNBECK, T. (2004). Effects of 17 α -ethinylestradiol in a fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadal recrudescence assay. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 57, 330-354.
- PINTO, P.I.S.; TEODOSIO, H.R.; GALAY-BORGOS, M.; POWER, D.M. & SWEENEY, G.E. (2006). Identification of estrogen-responsive genes in the testis of sea bream (*Sparus auratus*) using suppression subtractive hybridization. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 318-329.
- PUDNEY, J. (1993). Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. En: *The Sertoli Cell* (Russell, L.D., Griswold, M.D., eds.), pp. 611-657. Cache River Press, Clearwater.
- REMACLE, C. (1976). Actions hormonales sur les cellules germinales males de *Carassius auratus* L. en culture organotypique. *Gen. Comp. Endocrinol.* 29, 480-491.
- SAMPATH KUMAR, R.; IJIRI, S. & TRANT, J.M. (2000). Molecular biology of channel catfish gonadotropin receptors: 1. Cloning of a functional luteinizing hormone receptor and preovulatory induction of gene expression. *Biol. Reprod.* 64, 1010-1018.
- SCHLINGER, B.A. & ARNOLD, A.P. (1992). Circulating estrogens in a male songbird originate in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 7650-7653.
- SCHOLZ, S. & GUTZEIT, H.O. (2005). 17 α -Ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 50, 363-373.
- SCHULZ, R.W. & NÓBREGA, R.H. (2011). Regulation of Spermatogenesis. En: *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, Vol 1 (Farrell, A.P. ed.), pp. 627-634. Academic Press, San Diego.
- SCHULZ, R.W.; DE FRANÇA, L.R.; LAREYRE, J.-J.; LE GAC, F.; CHIARINI-GARCIA, H.; NOBREGA, R.H. & MIURA, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165, 390-411.
- SCHULZ, R.W.; LIEMBURG, M.; GARCÍA-LÓPEZ, A.; DIJK, W. & BOGERD, J. (2008). Androgens modulate testicular androgen production in African catfish (*Clarias gariepinus*) depending on the stage of maturity and type of androgen. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156 (1), 154-63.
- SCHULZ, R.W.; MENTING, S.; BOGERD, J.; FRANÇA, L.R.; VILELA, D.A. & GODINHO, H.P. (2005). Sertoli cell proliferation in the adult testis, evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol. Reprod.* 73, 891-898.
- SCOTT, A.P. & SUMPTER, J.P. (1989). Seasonal variations in testicular germ cell stages and in plasma concentrations of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*) maturing at 2 years old. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73, 46-58.

- SCOTT, A.P. (1987). Reproductive endocrinology of fish. En: Comparative vertebrate endocrinology, (Chester-Jones, I., Ingleton P.M., Philips, J.G., eds.), pp. 223-256. Plenum Press, New York.
- SEGNER, H.; CAROLL, K.; FENSKE, M.; JANSSEN, C.R.; MAACK, G.; PASCOE, D. y col. (2002a). Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 302-314.
- SEGNER, H.; NAVAS, J.M.; SCHAFERS, C. & WENZEL, A. (2003b). Potencies of estrogenic compounds in *in vitro* screening assays and in life cycle tests with zebrafish *in vivo*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 315-322.
- SINHA, G.M. & MONDAL, S.K. (1981). Detection and localization of alkaline phosphatase, DNA, glycogen, mucopolysaccharides and bound lipids in the testis of a teleost fish, *Channa punctatus* (Bloch), during the annual cyclical changes by histochemical methods. *Mikroskopie* 38, 228-240.
- SO, W.K.; KWOK, H.F. & GE, W. (2005). Zebrafish gonadotropins and their receptors: II. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits: their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. *Biol. Reprod.* 72, 1382-1396.
- SONG, M. & GUTZEIT, H.O. (2003). Effect of 17 α -ethynylestradiol on germ cell proliferation in organ and primary culture of medaka (*Oryzias latipes*) testis. *Dev. Growth Differ.* 45, 327-337.
- SPADELLA, M.A.; OLIVEIRA, C. & QUAGIO-GRASSIOTTO, I. (2007). Comparative analyses of spermiogenesis and sperm ultrastructure in Callichthyidae (Teleostei: Ostariophysi: Siluriformes). *Neotropical Ichthyol.* 5, 337-350.
- TAKEO, J. & YAMASHITA, S. (1999). Two distinct isoforms of cDNA encoding rainbow trout androgen receptors. *J. Biol. Chem.* 274, 5674-5680.
- TERNES, T.A.; STUMPF, M.; MUELLER, J.; HABERER, K.; WILKEN, R.D. & SERVOS, M. (1999). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants—I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ.* 225, 81-90.
- THORPE, K.L.; CUMMINGS, R.I.; HUTCHISON, T.H.; SCHOLZE, M.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J.P. y col. (2003). Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1142-1149.
- TODO, T.; IKEUCHI, T.; KOBAYASHI, T. & NAGAHAMA, Y. (1999). Fish androgen receptor: cDNA cloning, steroid activation of transcription in transfected cells, and tissue mRNA levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 378-383.
- TSAY, P.S.; KESSLER, A.E.; JAMES, J.T. & WARH, K.B. (2005). Alteration of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen- and androgen-treated adult male leopard frog, *Rana pipiens*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3, 2.
- TYLER, C.R. & ROUTLEDGE, E.J. (1998). Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appl. Chem.* 70, 1795-1804.
- UEDA, H.; KAMBEGAWA, A. & NAGAHAMA, Y. (1985). Involvement of gonadotrophin and steroid hormones in spermiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, and goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59, 309-325.
- VAN AERLE, R.; POUNDS, N.; HUTCHISON, T.H.; MAD-DIX, S. & TYLER, C.R. (2002). Window of sensitivity for the estrogenic effects of ethinylestradiol in early life-stages of fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Ecotoxicology* 11, 423-434.
- VAN DEN BELT, K.; VERHEYEN, R. & WITTERS, H. (2003). Effects of 17 α -ethynylestradiol in a partial life-cycle test with zebrafish (*Danio rerio*): effects on growth, gonads and female reproductive success. *Sci Total Environ.* 309, 127-137.
- VAN DEN BELT, K.; WESTER, P.W.; VAN DER VEN, L.T.M.; VERHETEN, R. & WITTERS, H. (2002). Effects of ethinylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 767-775.
- VAN DEN HURK, R.; SCHOONEN, W.G.; VAN ZOELLEN, G.A. & LAMBERT, J.G. (1987). The biosynthesis of steroid glucuronides in the testis of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, and their pheromonal function as ovulation inducers. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68, 179-188.
- VAN DER HORST, G. (1978). The structure of the testis of mullet, *Liza dumerili* (Teleostei, Mugilidae) with special reference to spermatogenesis. *Zool. Afr.* 13, 233-243.
- VAN DER VEN, L.T.; WESTER, P.W. & VOS, J.G. (2003). Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 908-913.
- VILELA, D.A.R.; SILVA, S.G.B.; PEIXOTO, M.T.D.; GODINHO, H.P. & FRANÇA, L.R. (2003). Spermatogenesis in teleost: Insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 187-190.
- VIZZIANO, D.; LEGAC, F. & FOSTIER, A. (1996). Effect of 17 β -estradiol, testosterone, and 11-ketotestosterone on 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one production in the rainbow trout testis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 104, 179-188.
- WAKABAYASHI, N.; SUZUKI, A.; HOSHINO, H.; NISHIMORI, K. & MIZUNO, S. (1997). The cDNA cloning and transient expression of a chicken gene encoding a follicle-stimulating hormone receptor. *Gene* 197, 121-127.
- WEBER, L.P.; HILL, R.L. & JANZ, D.M. (2003). Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): II. Histological evaluation of gametogenesis and organ toxicity. *Aquat. Toxicol.* 63, 431-446.
- WU, C.; PATINO, R.; DAVIS, K.B. & CHAND, X. (2001). Localization of estrogen receptor alpha and beta RNA in germinal and nongerminal epithelia of the channel catfish testis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 124, 12-20.
- ZHANG, X.; HECKER, M.; PARK, J.W.; TOMPSETT, A.R.; NEWSTED, J.; NAKAYAMA, K.; JONES, P.D.; AU, D.; KONG, R.; WU, R.S. & GIESY, J.P. (2008). Real-time PCR array to study effects of chemicals on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of the Japanese medaka. *Aqua. Toxicol.* 88, 173-182.
- ZHOU, Q.; LI, Y.; NIE, R.; FRIEL, P.; MITCHELL, D.; EVANOFF, R.M.; POUCHNIK, D.; BANASIK, B.; MCCARREY, J.R.; SMALL, C. & GRISWOL, M.D. (2008). Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (*Stra8*) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid *in vitro*. *Biol. Reprod.* 78, 537-545.
- ZIMMERMAN, S.; STEDING, C.; EMMEN, J.M.; BRINKMANN, A.O.; NAYERIA, K.; HOLSTEIN, A.F.; ENGEL, W. & ADHAM, I.M. (1999). Targeted disruption of the *Ins3* gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol. Endocrinol.* 13, 681-691.