







Eds. A.V.M. Canário, D.M. Power











Avanços em Endocrinologia Comparativa Vol. III

Eds. Adelino V. M. Canário e Deborah M. Power

AVANÇOS em Endocrinologia Comparativa. Vol. III / Adelino V. M. Canário e Deborah M. Power (eds.). – Faro Universidade do Algarve, 2007

262 p.; 22 cm

ISBN 978-972-9341-57-1

 Endocrinologia – Congressos I. Canário, A. V. M., ed. lit.
 II. Power, D. M., ed. lit. III. Associação Ibérica de Endocrinologia Comparativa. Congresso (5º. 2005. Faro) V. Centro de Ciências do Mar do Algarve 616.4 (063)

Avanços em Endocrinologia Comparativa. Vol. III

Adelino V. M. Canário e Deborah M. Power (eds.).

Ilustrações da capa:

© Universidade do Algarve, 2007 Campus de Gambelas, 8005-139 Faro www.ualg.pt email: infoccmar@ualg.pt

Edição realizada em colaboração com a Associação Ibérica de Endocrinologia Comparativa (AIEC)

ISBN: 978-972-9341-57-1

Impresso por:

Proibida a reprodução total ou parcial desta obra, por qualquer meio, sem autorização expressa do editor.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	11
PRESENTACIÓN	14
NUEVAS SEÑALES REGULADORAS DE LA PRODUCCIÓN DE HORMONA DEL CRECIMIENTO. M.M. Malagón, F. Rodríguez-Pacheco, R. Vázquez-Martínez, A.J. Martínez-Fuentes, F. Gracia-Navarro, S. Tovar, C. Diéguez, J.P. Castaño	16
ESTRES E INTERACCIONES INMUNOENDOCRINAS EN PECES: FUNCIONES DEL CORTISOL. L.Tort, L. Acerete, C. Liarte, S.MacKenzie	22
REPRODUCCIÓN Y VITELOGÉNESIS EN INSECTOS: EL CADMIO COMO ALTERADOR ENDOCRINO POTENCIAL EN Oncopeltus fasciatus. A. Cervera, N. López-Soler, R. Martínez-Pardo, M.D. Garcerá	28
GENOMIC DUPLICATION AND EVOLUTIVE DIVERGENCE OF FISH GROWTH HORMONE RECEPTORS. PHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS FOR GROWTH HORMONE AND SOMATOLACTIN MEDIATED EFFECTS. J. A. Calduch-Giner, A. Saera-Vila, J. Pérez-Sánchez	34
AVANCES EN LA REGULACIÓN HORMONAL DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL Y DE LA PUBERTAD DE LA LUBINA EUROPEA. M. Carrillo, S. Zanuy, G. Molés, A. Felip, B. Muriach, E. Mañanós, J.M. Cerdá-Reverter, I. Begtashi, L. Rodríguez	40
EFFECTS OF AGONIST AND ANTAGONIST OF THE COMPONENTS OF THE STEROIDOGENIC PATHWAY LEADING TO MALE AND FEMALE SEX DIFFERENTIATION IN THE SEA BASS (<i>Dicentrarchus labrax</i>). L. Navarro-Martín, C. Castel, M. Blázquez, F. Piferrer	46
RAB18 COMO COMPONENTE CLAVE DE LA RUTA SECRETORA EN CÉLULAS NEUROENDOCRINAS. R. Vázquez-Martínez, D. Cruz-García, J.P. Castaño, M.M. Malagón	50
CLONING AND EXPRESSION OF A MT1 MELATONIN RECEPTOR IN THE EUROPEAN SEA BASS (<i>Dicentrarchus labrax</i>). P. Herrera, L. Besseau, S. Sauzet, G. Boeuf, J. Falcón, J.A. Muñoz-Cueto	54
VARIACIÓN DEL PERFIL DE PROTEÍNAS PRESENTES EN EL PLASMA SEMINAL DURANTE EL PERIODO DE ESPERMIACIÓN DE LA ANGUILA EUROPEA Y RELACIÓN CON PARÁMETROS DE CALIDAD. D.S. Peñaranda, M.P. Viudes de Castro, D.L. Garzón, L. Pérez, J.S. Vicente, M. Jover, J.F. Asturiano	58
FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF PACAP RECEPTORS FROM SEA BREAM, Sparus auratus. J. Cardoso, E. de Vet, G. Elgar, D.M. Power	62

REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA SENSIBILIDAD DE LOS TEJIDOS A LA MELATONINA EN EL ANURO Rana perezi. LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA. E. Isorna, A.I. Guijarro, N. De Pedro, M.A. López-Patiño, M.J. Delgado, J. Falcón, A.L. Alonso-Gómez	66
GONADOTROPHIN-RELEASING-HORMONE MODULATES THE SECRETION OF MELATONIN IN SEA BASS, <i>Dicentrarchus labrax</i> . A. Servili, J.F. López-Olmeda, P. Herrera, F.J. Sánchez-Vázquez, J.A. Muñoz-Cueto	70
EFECTO DEL 17β-ESTRADIOL SOBRE LA ESPERMATOGÉNESIS DE DORADA (Sparus aurata L.). E. Chaves Pozo, V. Mulero, F.J. Arjona, L. Vargas-Chacoff, , A. García-Lopez, G. Martínez-Rodríguez, J. Meseguer, J.M. Mancera, A. García Ayala	74
CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS ISOFORMAS TRUNCADAS DE RECEPTORES DE SOMATOSTATINA. M. Durán-Prado, R. Vázquez-Martínez, B.J. González, C. Bucharles, H. Vaudry, S.J. Rhodes, S. García-Navarro, M.M. Malagón, J.P. Castaño	78
EFECTOS DE LA HORMONA 3, 5, 3-TRIIODO-L-TIRONINA (T ₃) SOBRE PARÁMETROS OSMORREGULADORES Y METÁBOLICOS EN LA DORADA <i>Sparus auratus</i> . L. Vargas-Chacoff, R. Laiz-Carrión, F.J. Arjona, P. Klaren, G. Flik, M.P. Martín del Río, J.M. Mancera	82
EFECTO DEL TERMOPERIODO SOBRE LA MADURACIÓN Y LOS NIVELES DE ESTEROIDES SEXUALES EN EJEMPLARES CULTIVADOS DE LENGUADO SENEGALÉS Solea senegalensis (KAUP, 1858). A. García-López, C. Sarasquete, G. Martínez-Rodríguez	86
REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR MELATONINA EN EL CARPÍN DORADO (<i>Carassius auratus</i>). R.M. Martínez-Álvarez, N. De Pedro, A.L. Alonso-Gómez, E. Isorna, M.J. Delgado	90
ACCIONES DE LA PROLACTINA Y LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO Y LA OSMORREGULACIÓN DE LA DORADA (Sparus auratus). S. Sangiao-Alvarellos, F.J. Arjona, S. Polakof, J.M. Míguez, M.P. Martín del Río, J.M. Mancera, J.L. Soengas	94
CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DEL RECEPTOR DE CORTISOL EN LA DORADA (Sparus aurata). L. Acerete, S. MacKenzie, L. Tort	98
INDUCCIÓN DE LA MADURACIÓN SEXUAL DE HEMBRAS DE ANGUILA EUROPEA: EXITOS Y FRACASOS. L. Pérez, D.S. Peñaranda, D.L. Garzón, M. Jover, J.F. Asturiano	102
ACCIONES OSMORREGULADORAS Y METABÓLICAS DE LA ARGININA VASOTOCINA (AVT) EN LA DORADA (Sparus auratus). S. Polakof, S. Sangiao-Alvarellos, F.J. Arjona, M.P. Martín del Río, J.M. Míguez, J.L. Soengas, J.M. Mancera	106
REGULACIÓN POR LA TEMPERATURA DE LA RITMICIDAD DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA EN LA TENCA (<i>Tinca tinca</i> L.). M.A. López-Patiño, A.I. Guijarro, E. Isorna, M.J. Delgado, A.L. Alonso-Gómez	110

MOLECULAR, HISTOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL CHANGES IN SKIN OF HALIBUT DURING METAMORPHOSIS. M.A. Campinho, N. Silva, G.E. Sweeneyl, D.M. Power	114
EFECTOS OSMORREGULADORES DE LA TESTOSTERONA EN EL TELEÓSTEO EURIHALINO Sparus auratus. F.J. Arjona; S. Sangiao-Alvarellos; S. Polakof; A. García-López; M.P. Martín del Río; G. Martínez-Rodríguez; J.L. Soengas, J.M. Mancera	118
EXPRESSION PATTERNS OF THE MAIN MLC ISOFORMS DURING HALIBUT (Hippoglossus hippoglossus L.) METAMORPHOSIS. N. Silva, V.M. Baptista and D.M. Power	122
CHRONIC CORTISOL ALTERS THE CENTRAL SEROTONERGIC SYSTEM IN THE RAINBOW TROUT (Oncorhynchus mykiss). M. Mancebo, G. Rozas, J.J. Perez, M. Aldegunde	126
EFECTO DE LA VASOTOCINA SOBRE LA SÍNTESIS DE MELATONINA EN EL ORGANO PINEAL DE LA TRUCHA ARCOIRIS: POSIBLE IMPLICACIÓN DE RECEPTORES V1. A. Rodríguez-Illamola, M. Gesto, R.M. Ceinos, B. Fernández-Durán, J.L. Soengas, J.M. Míguez	130
CLONING OF A THYROID STIMULATING HORMONE RECEPTOR FROM THE GONADS OF EUROPEAN SEA BASS, <i>Dicentrachus labrax</i> . A. Rocha, A. Gómez, S. Zanuy, M. Carrillo	134
NEUROPEPTIDERGIC AND AMINERGIC SYSTEMS IN THE BRAIN AND PITUITARY OF THE MEAGRE, Argyrosomus regius. F. Confente, M.C. Rendón, M.L. González de Canales, J.A. Muñoz-Cueto	136
IDENTIFICATION OF POLYMORPHISMS IN ENDOCRINE RELATED TRANSCRIPTS IN THE SEA BREAM (Sparus auratus). B.P. Louro and D.M. Power	140
PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO (FSH) DE LUBINA (<i>Dicentrarchus labrax</i>). G. Molés, A. Gómez, A. Rocha, M. Carrillo, S. Zanuy	144
SEASONAL CHANGES IN THE DAILY RHYTHMS OF INDOLES, MELATONIN AND OTHER 5-METHOXYINDOLES IN THE PINEAL ORGAN OF TROUTS EXPOSED TO NATURAL PHOTOPERIOD. R.M. Ceinos, A. Rodríguez-Illamola, M. Gesto, S. Sangiao-Alvarellos, J.L. Soengas, J.M. Míguez	146
EFECTO DE LA EDAD SOBRE EL RITMO CIRCADIANO DEL NEUROTRANSMISOR SEROTONINA EN LA TÓRTOLA COLLARIZA (Streptopelia roseogrisea). S.D. Paredes, M.P. Terrón, V. Valero, C. Barriga, A.B. Rodríguez	150
CORRELACIONES ENTRE LOS RITMOS CIRCADIANOS DE MELATONINA, SEROTONINA Y ACTIVIDAD/REPOSO EN TÓRTOLAS COLLARIZAS (<i>Streptopelia roseogrisea</i>) JÓVENES Y VIEJAS. S.D. Paredes, M.P. Terrón, V. Valero, C. Barriga, A.B. Rodríguez	154
CAMBIOS EN LOS NEUROTRANSMISORES CEREBRALES EN LA TRUCHA ARCO IRIS TRAS LA EXPOSICIÓN A NAFTALENO. M. Gesto, A. Tintos, R.M. Ceinos, A. Rodríguez-Illamola, J.L. Soengas, J.M. Míguez	158

EFECTOS HORMONALES Y METABÓLICOS DE LA EXPOSICIÓN A NAFTALENO EN LA TRUCHA ARCO IRIS <i>Oncorhynchus mykiss.</i> A. Tintos, M. Gesto, S. Sangiao-Alvarellos, R.M. Ceinos, J.M. Míguez, J.L. Soengas16
AGREGACIÓN DE CÉLULAS PANCREÁTICAS ENDOCRINAS OBTENIDAS MEDIANTE DISPERSIÓN ENZIMÁTICA A PARTIR DE ISLOTES PRINCIPALES DE LUBINA (<i>Dicentrarchus labrax</i>). M.P. García Hernández, A. González Sarrías, M.T. Lozano, M. T. Elbal, B. Agulleiro16
EVOLUTION OF PEPTIDES OF THE SECRETIN FAMILY IN VERTEBRATES. F. Vieira, J. Cardoso, D.M. Power17
ANÁLISIS DEL SISTEMA GHRELINA/RECEPTOR DE SECRETAGOGOS DE GH (GHS-R) EN SOMATOTROPAS PORCINAS. F. Rodríguez-Pacheco, M.D. Culler, S. Klussmann, S. García-Navarro, J.P. Castaño, M.M. Malagón
ROLE OF IGF-II IN THE PI3K/Akt AND MAPK SIGNALLING PATHWAYS IN RAINBOW TROUT (Oncorhynchus mykiss). M. Codina, D. García de la Serrana, O. Chistyakova, N. Montserrat, I. Navarro, J. Gutiérrez
REGULATION OF LIPOPROTEIN LIPASE (LPL) ACTIVITY IN RAINBOW TROUT (Oncorhynchus mykiss) TISSUES: ROLE OF INSULIN. A. Albalat, L. Bouraoui, J. Sánchez-Gurmaches, J. Gutiérrez, I. Navarro
EXPRESSION OF MYOGENIC REGULATORY FACTORS AND MUSCULAR GENES IN RESPONSE TO ECTOPIC EXPRESSION OF IGF-I BY INTRAMUSCULAR DNA INJECTION IN ZEBRAFISH (Danio rerio). M. Codina, C. Rallière, J.C. Gabillard, I. Navarro, J. Gutiérrez, P.Y. Rescan
PAPEL DE LOS RECEPTORES PORCINOS DE GHRELINA Y DE SOMATOSTATINA TIPO 2 (sst2) SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR. M. Molina, M. Durán-Prado, A.J. Martínez-Fuentes, F. Gracia-Navarro, J.P. Castaño, M.M. Malagón
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA LIPOPROTEIN LIPASA DE DORADA (Sparus aurata). A. Saera-Vila, J.A. Calduch-Giner, J. Pérez-Sánchez
BRAIN GLYCOGENOLYSIS IS INDUCED BY SEROTONIN IN THE RAINBOW TROUT (Oncorhynchus mykiss). J.J. Perez, M Mancebo, R.I. Caamaño, L. Rodríguez, M. Aldegunde
EFECTOS DIRECTOS DE KISS-1 SOBRE LAS SOMATOTROPAS Y LAS GONADOTROPAS HIPOFISARIAS. E. Gutiérrez-Pascual, A.J. Martínez-Fuentes, F. Rodríguez-Pacheco, M. Durán-Prado, M. Tena-Sempere, M.M. Malagón, J.P. Castaño
EFECTOS DE INSULINA E IGF-I SOBRE LA EXPRESIÓN DE GH Y DE LOS RECEPTORES DE GHRH (GHRH-R) Y GRELINA (GHS-R), EN CÉLULAS HIPOFISARIAS DE RATÓN Y PAPIÓN (<i>Papio anubis</i>) EN CULTIVO. R.M. Luque, M.D. Gahete, M.M. Malagón, J.P. Castaño, R.D. Kineman

PUTATIVE GLUC/GIP RECEPTOR GENES IN VERTEBRATES. V. Pinto, J. Cardoso, D.M. Power2	10
EL NUEVO ANÁLOGO SINTÉTICO SOM230 OFRECE NUEVAS PRUEBAS SOBRE EL EFECTO DUAL DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA LIBERACIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO. A.J. Martínez-Fuentes, R.M. Luque, H.A. Schmid, M.M. Malagón, J.P. Castaño2	!14
DISTRIBUTION AND CELLULAR LOCALIZATION OF SEA BREAM ESTROGEN RECEPTORS IN CALCIFIED TISSUES. P.I.S. Pinto, M.D. Estêvão, B. Redruello, D.M. Power, A.V.M. Canário	:18
EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS EXPRESSION IN TELEOST FISH SCALES. M.D. Estêvão and D.M. Power2	22
A COMPARATIVE STUDY OF PUTATIVE PHEROMONES IN THE REPRODUCTION OF TWO CLOSELY RELATED BLENNIES, Salaria pavo AND S. fluviatilis (Pisces: Blenniidae). R.M.L. Serrano, E.N. Barata, P.S. Guerreiro, P.C. Hubbard, M.A. Birkett, J.A. Picket, A.V.M. Canário2.	24
EFECTOS DEL CADMIO SOBRE EL CONTENIDO DEL POLIPÉPTIDO ESPECÍFICO DE HEMBRAS VG2 EN HEMOLINFA Y OVARIOS DE <i>Oncopeltus fasciatus</i> (Hemiptera: Heteroptera). A. Cervera, N. López-Soler, R. Martínez-Pardo, M.D. Garcerá	28
IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE UN TERCER POLIPÉPTIDO ESPECÍFICO DE HEMBRAS EN HEMOLINFA Y OVARIOS DE Oncopeltus fasciatus (Hemiptera: Heteroptera). A. Cervera, N. López-Soler, R. Martínez-Pardo, M.D. Garcerá	:32
EFFECT OF RETINOIC ACID ON SKELETAL ONTOGENY IN TILAPIA (<i>Oreochromis mossambicus</i>). Â. Ramos and D.M. Power2	:36
ÍNDICE DE AUTORES2	40

INTRODUÇÃO

No seguimento de números anteriores, "Avanços em Endocrinologia Comparativa" permite avaliar, em cada dois anos, o progresso dos grupos ibéricos que utilizam a análise comparativa de animais para inferir sobre a evolução dos sistemas endócrinos, naquilo que lhes é fundamental ou particulariza cada um deles.

A abordagem comparativa, se bem que por vezes mal compreendida, transporta consigo muitas recompensas. Foi por comparação que os estudos de anatomía começaram na Grécia antiga e que na fisiologia moderna se traduziram no que é conhecido pelo princípio de August Krogh (1874-1949) – "para muitos problemas há um animal em que pode ser mais convenientemente estudado". O crescente número de espécies animais "modelo" confirma que o princípio está activo. Por outro lado, hoje é possível na maioria dos laboratórios investigar em escalas de grandeza multidimensionais com um largo leque de ferramentas disponíveis, o que tem proporcionado avanços significativos na compreensão dos sistemas endócrinos e no detalhe dos mecanismos de acção. Novas sínteses e importantes avanços sucedem-se a velocidades crescentes.

Resulta assim que a endocrinologia comparativa é um campo previlegiado de formação para os jovens investigadores, onde conjugam a possibilidade de testar hipóteses relevantes com o treino nas técnicas mais recentes.

Foram, aliás, os jovens estudantes e investigadores que motivaram a criação da Associação Ibérica de Endocrinologia Comparativa e a dinâmica criada é atestada pela qualidade do conjunto importante e crescente de contribuições. É com curiosidade e entusiasmo que nos preparamos para o próximo encontro.

Os editores Adelino V M Canário e Deborah M Power

PRESENTACIÓN

El seguimiento de los números anteriores de "Avances de endocrinología comparada" permite evaluar, de dos en dos años, el progreso de los grupos ibéricos que utilizan un análisis comparativo de los animales para inferir la evolución de los sistemas endocrinos, analizando aquello que les es fundamental o particulariza cada uno de ellos.

El enfoque de vista comparativo, si bien es a veces malinterpretado, conlleva muchas recompensas. Fue justamente por trabajos comparativos que los estudios de anatomía comenzaron en la Grecia antigua y más tarde en la fisiología se tradujeron en lo que es conocido como el Principio de August Krogh (1874-1949): " para la mayoría de los problemas hay un animal en el que puede ser más conveniente su estudio". El creciente número de especies animales "modelo" confirma que el principio esta aún activo. Por otro lado, hoy es posible investigar en la mayoría de laboratorios a escala multidimensional con un amplio abanico de herramientas disponibles, hecho que ha proporcionado avances significativos en la comprensión de los sistemas endocrinos y en el detalle de sus mecanismos de acción. Actualmente nuevas síntesis e importantes avances se dan a gran velocidad.

Como resultado la endocrinología comparativa es un campo privilegiado para la formación de jóvenes investigadores, donde se unen la posibilidad de testar hipótesis relevantes con el ensayo de las técnicas más recientes.

Fueron, además, los jóvenes estudiantes e investigadores los que motivaron la creación de la Sociedad de Endocrinología Comparada, y la dinámica creada es atestiguada por la importante calidad de conjunto y el creciente número de publicaciones. Es por tanto, con curiosidad y entusiasmo, que nosotros preparamos el próximo encuentro.

Los editores Adelino V M Canário y Deborah M Power

NUEVAS SEÑALES REGULADORAS DE LA PRODUCCIÓN DE **HORMONA DEL CRECIMIENTO**

M.M. Malagón, F. Rodríguez-Pacheco, R. Vázquez-Martínez, A.J. Martínez-Fuentes, F. Gracia-Navarro, S. Tovar¹, C. Diéguez¹, J.P. Castaño

Dpto. Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba. España. ¹Dpto. Fisiología, Universidad de Santiago de Compostela, España.

RESUMEN. La secreción de hormona del crecimiento (GH) está sometida a un control múltiple en el que participan numerosos factores, tanto de origen central, como los factores hipotalámicos primarios GHRH y somatostatina, como periféricos. En este capítulo, revisamos los últimos descubrimientos respecto a la participación en la regulación de las somatotropas de tres nuevos factores que, aunque de origen periférico, también se expresan en la propia hipófisis: ghrelina, adiponectina y resistina. Los datos disponibles en la actualidad muestran que estos factores ejercen un efecto múltiple y complejo sobre las somatotropas, sugiriendo la existencia de una relación funcional entre GH y estas hormonas que puede ser importante para el control de la ingesta, el metabolismo y el balance energético.

INTRODUCCIÓN

La secreción de GH por las somatotropas hipofisarias está regulada primariamente por la interacción compleja de dos factores sintetizados en el hipotálamo, el estimulador GHRH y el inhibidor somatostatina, que alcanzan la hipófisis a través del sistema porta hipotálamo-hipofisario. No obstante, desde el aislamiento y la caracterización de estos péptidos como reguladores clave de las somatotropas, lo que tuvo lugar en 1973 para el caso de la somatostatina y en 1982 para la GHRH (revisado por 1), se han identificado otros factores que actúan fundamentalmente como moduladores de la secreción de GH, bien ejerciendo una acción directa sobre las células somatotropas o indirectamente, actuando sobre las neuronas hipotalámicas productoras de GHRH o somatostatina (revisado por 2). En los últimos años, gran parte de la investigación sobre el eje somatotrópico se ha centrado en las señales periféricas relacionadas con el metabolismo ya que la GH juega un papel fundamental en la regulación del metabolismo intermediario, la composición corporal y el gasto energético. Así, mediante su acción sobre el tejido adiposo, el músculo y el hígado, la GH actúa dirigiendo el metabolismo energético hacia la oxidación preferente de los lípidos en vez de hacia el catabolismo de las proteínas o de la glucosa y dirigiendo a su vez la energía derivada de los procesos metabólicos hacia la síntesis de proteínas (3). De manera recíproca, los ácidos grasos libres, los aminoácidos y la glucosa regulan directamente la secreción de GH. En este contexto, cabría esperar la existencia de un regulador, una hormona, que enlazara la regulación de la secreción de GH y, por tanto, el control del crecimiento somático, y la regulación del metabolismo y que, a su vez, estuviera regulada por el balance energético del organismo (4). En la actualidad se acepta que este papel dual lo podría ejercer un péptido de reciente descubrimiento, la ghrelina (4, 5). Por otra parte, cada vez es más evidente que el tejido adiposo, además de actuar como reservorio de grasa, es un órgano endocrino activo que secreta numerosas proteínas con actividad biológica, denominadas en conjunto

adipoquinas, tres de las cuales están directamente implicadas en el control de

la homeostasis energética: leptina, adiponectina y resistina (revisado en 6). Aunque existen numerosas evidencias que apoyan la influencia directa e indirecta de la leptina sobre la producción de GH (7), aún se desconoce el efecto de las otras dos adipoquinas sobre el eje somatotrópico. Por su parte, estudios recientes han demostrado que la GH regula la expresión de adiponectina (8) y resistina (9) en el tejido adiposo, por lo que cabría la posibilidad de que, como en el caso de la leptina, estas adipoquinas también controlaran la producción de GH.

En el presente capítulo, haremos una revisión de los más recientes descubrimientos sobre el efecto y los mecanismos de acción de ghrelina, adiponectina y resistina sobre las somatotropas.

Acción de la Ghrelina sobre las somatotropas

En 1975, Bowers y colaboradores diseñaron derivados de la met-encefalina que estimulaban la secreción de GH por la hipófisis in vitro, iniciando con ello el desarrollo de varios compuestos sintéticos denominados en conjunto secretagogos sintéticos de GH (GHSs). Varios estudios demostraron que esta familia de compuestos, que incluye tanto sustancias de naturaleza peptídica como no peptídica actuaban directamente sobre las células somatotropas mediante su unión a un receptor específico, el GHS-R, diferente del que usa el GHRH, perteneciente a la familia de receptores de siete dominios transmembrana (7DTM) acoplados a proteínas G (revisado por 10).

El descubrimiento de un receptor para los GHSs indicaba claramente que debía existir un ligando endógeno para dicho receptor y, efectivamente, en 1999 Kojima y colaboradores (5) descubrieron que extractos de estómago de rata eran capaces de inducir la movilización de Ca²⁺ en células transfectadas con el receptor GHS-R. A partir de estos extractos, aislaron la ghrelina cuya denominación procede del proto-Indo-europeo, donde ghre es la raíz de crecimiento y relin significa liberación. Se trata de un péptido de 28 aminoácidos, que se caracteriza porque está acilado en la Ser3, lo cual es fundamental para la actividad biológica de la molécula. Además de producirse en el estómago, la ghrelina también se expresa en hipotálamo, lo que fundamenta las acciones hipofisotrópicas de la ghrelina, así como en otros órganos y tejidos periféricos, incluida la propia hipófisis (revisado por 11).

Diversos estudios han confirmado el efecto estimulador de la ghrelina sobre la secreción de GH tanto in vivo como in vitro en vertebrados, incluidos los peces (12). Resultados de nuestro laboratorio han permitido demostrar que la ghrelina también induce la secreción de GH en cultivos de células adenohipofisarias porcinas, ejerciendo un efecto similar al del factor hipotalámico GHRH (13). Mediante el uso de inhibidores específicos de señalizadores intracelulares hemos podido determinar las rutas de transducción implicadas en la acción de la ghrelina sobre la secreción de GH en esta especie (13). De esta manera confirmamos que, como se había demostrado previamente para varios GHSs (10), la activación consecutiva de la fosfolipasa C (PLC) y de la proteína quinasa C (PKC) son esenciales para que la ghrelina estimule la liberación de GH. Más aún, determinamos que ésta no es la única ruta activada por la ghrelina en las somatotropas porque el efecto secretor de este péptido también desaparece si se bloquea la adenilato ciclasa (AC) y, de hecho, la ghrelina induce la producción de AMPc en la hipófisis. De la misma forma, la inactivación de la proteína guinasa A (PKA), también inhibe la acción de la ghrelina por lo que, en conjunto, nuestros datos permitieron mostrar, por primera vez, que la ruta de la AC/AMPc/PKA también media los efectos de la ghrelina sobre la secreción de GH. Más aún, la

ghrelina también induce la apertura de canales de Ca²⁺ sensibles a voltaje de la membrana y el aumento subsiguiente de la concentración intracelular de este ion ([Ca²⁺]_i) es responsable del efecto estimulador del péptido sobre la secreción de GH, mientras que los reservorios intracelulares de Ca²⁺ no parecen contribuir a la acción secretora del péptido. Por último, descubrimos que la ghrelina también requiere la activación del sistema de la óxido nítrico sintasa (NOS)/óxido nítrico NO así como de la ruta subsiguiente de la guanilato ciclasa (GC)/GMPc para inducir la secreción de GH (14). Por tanto, la ghrelina activa múltiples rutas de señalización intracelular en las somatotropas para estimular la secreción de GH, rutas que probablemente están relacionadas a través de procesos de *cross-talk*.

La complejidad del sistema ghrelina/GHS-R no sólo se restringe a los fenómenos post-receptor ya que la activación del GHS-R por la ghrelina, además de poner en marcha varias rutas de señalización, también induce importantes cambios en la expresión varios receptores clave de la somatotropa. Así, estudios de RT-PCR de nuestro laboratorio (15) permitieron demostrar que la ghrelina provoca una disminución de los niveles de ARNm del GHS-R1a en cultivos de células adenohipofisarias porcinas. Más aún, este efecto inhibidor de la ghrelina también se ejerce sobre el receptor del factor hipotalámico GHRH, cuya expresión disminuye de manera significativa en presencia del péptido. De manera recíproca, el GHRH también reduce la expresión de su propio receptor y la del GHS-R (15). Además, ambos factores, ghrelina y GHRH, reducen los niveles de transcritos de un subtipo de receptor de somatostatina, el sst5, que parece mediar el efecto estimulador paradójico que la somatostatina ejerce sobre la secreción de GH en la especie porcina (16). En definitiva, nuestros datos muestran que la ghrelina estimula a corto plazo la secreción de GH, pero, además, también reduce la expresión de aquellos receptores que pueden mediar una respuesta estimuladora en las somatotropas, el GHS-R1a, el GHRH-R y el sst5, quizás como un mecanismo para contrarrestar una posible sobreestimulación posterior.

En suma, nuestros resultados han permitido desvelar la multiplicidad y complejidad de las acciones y mecanismos de señalización de la ghrelina en las somatotropas e indican que este péptido debe ser considerado como un regulador clave de este tipo celular, el cual puede llegar a las somatotropas por vía neuroendocrina, procedente del hipotálamo, por vía endocrina, procedente del estómago, o incluso por vía paracrina, por la ghrelina producida en la hipófisis de forma endógena.

Acción de la adiponectina sobre las somatotropas

La adiponectina es una proteína de 230 aminoácidos sintetizada y secretada por los adipocitos que fue aislada casi simultáneamente por cuatro grupos independientes, recibiendo por ello varias denominaciones (Acrp30, GBP28, APM-1 y AdipoQ; revisado por 17). Esta adipoquina actúa sobre el músculo, facilitando la captación de glucosa, estimulando la oxidación de ácidos grasos y disminuyendo el contenido en triglicéridos, y sobre el hígado, donde, además de estas dos últimas acciones, también disminuye la gluconeogénesis. En definitiva, la adiponectina facilita la acción de la insulina en estos tejidos, por lo que se considera que es una hormona antidiabética. De hecho, los ratones KO en adiponectina muestran resistencia a insulina y diabetes y, en humanos, el nivel sanguíneo de adiponectina está disminuido en pacientes obesos o con diabetes de tipo II, enfermedad estrechamente ligada con la obesidad (revisado por 17).

Las acciones de la adiponectina están presumiblemente mediadas por dos tipos de receptores denominados AdipoR1 y AdipoR2. Ambos poseen 7DTM aunque son funcional y estructuralmente diferentes a los clásicos receptores de 7DTM acoplados a proteínas G. La expresión de estos receptores está regulada por la insulina y en función del status energético pero, además, curiosamente, la GH, que en exceso provoca resistencia a insulina, disminuye los niveles de AdipoR2 (8). Este efecto de la GH, junto con la observación de que esta hormona también disminuye la expresión de adiponectina en el tejido adiposo (8) sugerían que, de manera recíproca, la adiponectina podría regular, a su vez, la producción de GH por las somatotropas. Para investigar esta hipótesis, en nuestro laboratorio hemos iniciado recientemente el análisis del efecto de la adiponectina en cultivos de células hipofisarias de rata macho adulta. Dicho análisis ha permitido demostrar que la adiponectina actúa efectivamente sobre las somatotropas disminuyendo la secreción de GH de manera significativa tras 4 h de tratamiento a partir de una concentración de 10⁻⁹ M, lo que sugiere que la adiponectina podría ser un nuevo regulador somatotrópico. En apoyo de esta idea, hemos conseguido demostrar mediante RT-PCR, por primera vez, que los dos AdipoRs se expresan en la hipófisis. No obstante, su expresión no varía a las 4 h de tratamiento si bien, a más largo plazo (24 h), la adiponectina parece ejercer un efecto inhibidor sobre la expresión de AdipoR1. Curiosamente, la adiponectina sí afecta a la expresión de otros receptores de las somatotropas a corto plazo (4 h) y, concretamente, aumenta la expresión tanto del GHS-R como del GHRH-R, recuperándose los niveles basales de ARNm de ambos receptores a las 24 h de cultivo en presencia de la proteína. Parece por tanto que la adiponectina, que actuaría como un potencial inhibidor de la secreción de GH, aumenta la expresión de receptores susceptibles de mediar un efecto estimulador sobre las somatotropas, lo que en principio, podría servir para facilitar una respuesta secretora de la célula tras un período de inhibición de la liberación de GH. Además, a más largo plazo inhibiría la expresión de al menos uno de sus receptores, contribuyendo quizás a impedir una respuesta inhibitoria excesiva. En conjunto, estos datos, junto con lo descrito por otros grupos sobre la acción inhibidora de la GH sobre la expresión de adiponectina y sus receptores (8), permiten proponer la existencia de un circuito hormonal que establecería una conexión funcional entre el tejido adiposo y la hipófisis y, con ello, la coordinación de la acción de dos hormonas, adiponectina y GH, importantes en la regulación del metabolismo intermediario.

Acción de la resistina sobre las somatotropas

La resistina es una proteína de 108 aminoácidos en humanos que no muestra homología con ninguna otra proteína caracterizada con anterioridad aunque presenta diez Cys que están conservadas en otras proteínas relacionadas, las RELM (Resistin-like molecules), por lo que se ha propuesto que, junto con éstas, forma una nueva familia de citoquinas (revisado por 18). La denominación de esta proteína hace referencia a los primeros resultados obtenidos sobre su función que mostraban su capacidad para inducir resistencia a la insulina, ya que antagoniza la acción de la insulina en hígado, músculo y tejido adiposo, provocando con ello intolerancia a glucosa (19). Aún se desconoce el receptor(es) que median las acciones de la resistina.

Además de las funciones mencionadas, es posible que la resistina pueda actuar en otros tejidos ya que se ha visto que, aunque se produce fundamentalmente en el tejido adiposo, esta proteína también se expresa en otros tejidos, incluidos el hipotálamo y la hipófisis (20), por lo que podría

regular la actividad de los mismos. En el caso particular de la hipófisis, v puesto que se ha demostrado que la GH aumenta los niveles de ARNm de resistina en el tejido adiposo (9), cabría la posibilidad de que, de manera recíproca, la resistina pudiera actuar sobre las somatotropas. De acuerdo con esta hipótesis, estudios recientes de nuestro laboratorio han mostrado que la resistina ejerce un efecto estimulador de la secreción de GH en cultivos adenohipofisarios de rata, efecto que aparece a las 4 h y se hace más evidente a las 24 h de tratamiento. Estos resultados sugieren que la resistina, cuya función sobre el metabolismo de la glucosa es opuesta a la ejercida por la adiponectina, ejerce también un efecto contrario a esta otra adipoquina con respecto la secreción de GH por las somatotropas. De acuerdo con esta idea, la resistina provoca a corto plazo, tras 4 h de tratamiento, una disminución de la expresión del GHS-R. Además, también regula la expresión de los receptores de adiponectina, reduciendo el nivel de transcritos de AdipoR1. A más largo plazo, los efectos se invierten, en tanto que la resistina aumenta la expresión de GHRH-R de adipoR2, mientras que desaparece su efecto sobre el GHS-R v sobre adipoR1.

Para analizar la posible implicación del Ca²⁺ en la acción de la resistina sobre las somatotropas, utilizamos un sistema de microfluorimetría con la sonda Fura-2 que ha permitido demostrar que esta proteína provoca un aumento neto de este segundo mensajero en una elevada proporción de somatotropas. La relevancia de estos resultados reside en que, además de demostrar que la resistina ejerce una acción directa sobre las somatotropas y, por tanto, que estas células expresan el receptor de resistina, han permitido identificar, por primera vez, uno de los posibles segundos mensajeros asociados a la activación del receptor, lo que sin duda podrá facilitar la identificación del mismo. Por tanto, en vista de estos resultados, se puede proponer que la resistina es un regulador de las células somatotropas, en las que actúa de forma directa, controlando tanto la secreción de GH como la expresión de los receptores clave que determinan la respuesta de estas células.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de CVI-139 (Junta de Andalucía, España) y BFU2004-03883 (Ministerio de Educación y Ciencia, España).

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Guillemin R 2005 Hypothalamic hormones a.k.a. hypothalamic releasing factors. *J Endocrinol* 184:11-28.
- Giustina A, Veldhuis JD 1998 Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev* 19:717-197.
- 3. Mauras N, Haymond MW 2005 Are the metabolic effects of GH and IGF-I separable? *Growth Horm IGF Res* 15:19-27.
- 4. Casanueva FF, Dieguez C 2002 Ghrelin: the link connecting growth with metabolism and energy homeostasis. *Rev Endocr Metab Disord* 3,325-338.
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K 1999 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature 402:656-660.
- Rajala MW, Scherer PE 2003 Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144:3765-3773.

- 7. Zieba DA, Amstalden M, Williams GL 2005 Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. Domest Anim Endocrinol 29:166-185.
- 8. Nilsson L, Binart N, Bohlooly-Y M, Bramnert M, Egecioglu E, Kindblom J, Kelly PA, Kopchick JJ, Ormandy CJ, Ling C, Billig H 2005 Prolactin and growth hormone regulate adiponectin secretion and receptor expression in adipose tissue. Biochem Biophys Res Commun 331:1120-1126.
- 9. Delhanty PJ, Mesotten D, McDougall F, Baxter RC 2002 Growth hormone rapidly induces resistin gene expression in white adipose tissue of spontaneous dwarf (SDR) rats. Endocrinology 143:2445-2448.
- 10. Smith RG 2005 Development of growth hormone secretagogues. Endocr Rev 26:346-360.
- 11. Kojima M, Kangawa K 2005 Ghrelin: structure and function. Physiol Rev 85:495-522.
- 12. Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Riley LG, Hirano T, Grau EG, Kangawa K 2003 Amidated fish ghrelin: purification, cDNA cloning in the Japanese eel and its biological activity. J Endocrinol 176:415-423.
- 13. Malagón MM, Lugue RM, Ruiz-Guerrero E, Rodríguez-Pacheco F, Garcia-Navarro S, Casanueva FF, Gracia-Navarro F, Castaño JP 2003 Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. Endocrinology 144:5372-5380.
- 14. Rodríguez-Pacheco F, Lugue RM, Garcia-Navarro S, Gracia-Navarro F, Castaño JP, Malagón MM 2005 Ghrelin induces growth hormone (GH) secretion via nitric Oxide (NO)/cGMP signaling. Ann N Y Acad Sci. 1040:452-453.
- 15. Luque RM, Kineman RD, Park S, Peng XD, Gracia-Navarro F, Castaño JP, Malagón MM 2004 Homologous and heterologous regulation of pituitary receptors for ghrelin and growth hormone-releasing hormone. Endocrinology 145:3182-3189.
- 16. Luque RM, Park S, Peng XD, Delgado E, Gracia-Navarro F, Kineman RD, Malagón MM, Castaño JP 2004 Homologous and heterologous in vitro regulation of pig pituitary somatostatin receptor subtypes, sst1, sst2 and sst5 mRNA. J Mol Endocrinol 32:437-448.
- 17. Kadowaki T, Yamauchi T 2005 Adiponectin and adiponectin receptors. Endocr Rev 26:439-451.
- 18. Adeghate E 2004 An update on the biology and physiology of resistin. Cell Mol Life Sci 61:2485-2496.
- 19. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA 2001 The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature 409:307-312.
- 20. Morash BA, Willkinson D, Ur E, Wilkinson M 2002 Resistin expression and regulation in mouse pituitary. FEBS Lett 526:26-30.

ESTRES E INTERACCIONES INMUNOENDOCRINAS EN PECES: FUNCIONES DEL CORTISOL

L.Tort, L. Acerete, C. Liarte, S. MacKenzie

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universitat Autonoma de Barcelona.

RESUMEN. La respuesta al estrés, universal en los animales, implica en los vertebrados una conexión neuroinmunoendocrina. Los peces ofrecen un modelo único ya que en el riñón anterior coinciden estos tres sistemas. Dicho órgano tiene terminales sinápticos directos del cerebro, posee las células cromafines e interrenales que segregan las hormonas implicadas en los dos ejes de respuesta al estrés y además es el órgano en donde se producen los glóbulos blancos, implicados en la respuesta inmune y en los procesos de maduración y migración a los tejidos infectados. La hormona mejor estudiada en los peces es el glucocorticoide cortisol y aunque la respuesta del cortisol al estrés es bastante conocida, se ha especulado sobre si esta hormona tiene fundamentalmente una acción depresora respecto al sistema inmune. Los trabajos realizados en los últimos tiempos modifican en parte esta hipótesis e indican que el cortisol sería realmente un modulador de la respuesta más que un inhibidor. Así, en condiciones de infección experimental, el cortisol ejercería una acción inhibidora sobre una parte de la respuesta inmune, fundamentalmente los aspectos relacionados con la síntesis de nuevas células y en los órganos centrales, mientras que en la periferia no tendría efectos supresores y aún protectores de apoptosis.

INTRODUCCIÓN

La respuesta al estrés implica un complejo mecanismo fisiológico en el que intervienen un gran número de elementos, desde los sensores del sistema nervioso en la percepción del estímulo estresante y los sistemas de regulación, endocrino e inmune, hasta las respuestas inespecíficas celulares como las proteínas de fase aguda y Hsp. La respuesta al estrés es universal en los animales y los mecanismos implicados pueden variar según la complejidad de cada especie, pero son semejantes en muchos casos, especialmente en los vertebrados.

Una de estas características comunes es el hecho de que en casos de alarma existe una conexión neuroendocrina (bien establecida en los peces), inmunoendocrina (menos conocida) y probablemente neuroinmune (poco conocida). Los peces ofrecen un modelo único respecto al estudio del estrés y de estas conexiones entre sistemas reguladores ya que en el riñón anterior coinciden estos tres sistemas. Dicho órgano tiene terminales sinápticos directos del cerebro, posee las células cromafines e interrenales que segregan las hormonas implicadas en los dos ejes de respuesta al estrés (catecolaminas y glucocorticoides) y además es el órgano en donde se producen los glóbulos blancos, implicados en la respuesta inmune y desde donde se inician los procesos de maduración y migración a los tejidos afectados. Así, el riñón anterior de los peces es un órgano central en la organización de la respuesta a las situaciones estresantes incluyendo las infecciones.

La hormona mejor estudiada en los peces es el glucocorticoide cortisol y en cambio se conocen mucho menos las catecolaminas debido a la dificultad

experimental y analítica de las segundas. Aunque la respuesta hormonal al estrés medida en niveles de cortisol es bastante conocida, se ha especulado sobre si esta hormona tiene fundamentalmente una acción depresora respecto al sistema inmune. Los estudios disponibles indican que en muchos casos puede ser así y ello se explicaría porque el organismo priorizaría algunos procesos como la consecución rápida de energía inmediatamente disponible, a costa de otros procesos que verían afectada su dinámica metabólica y energética, entre ellos los mecanismos de respuesta inmune. En este trabajo se discute el papel del cortisol en relación al sistema inmune en función de los últimos resultados disponibles sobre su actividad respecto al número y función de los glóbulos blancos y sobre las citoquinas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Experimentos in vivo:

Los experimentos in vivo se realizaron en grupos de 10 peces (trucha, Oncorhynchus mykiss o doradas Sparus aurata) por duplicado una vez los especímenes estuvieron aclimatados por espacio de un mes a las condiciones del estabulario (fotoperiodo constante 12L:12D, temperatura 17°C, densidad de 8 kg/m³, oxígeno a 8mg/kg y niveles basales de amonio y nitritos).

Los experimentos de estrés fueron los siguientes: Para el estrés agudo, se someten los peces a una captura consistente en sacar los peces fuera del agua durante 30 segundos y dejándoles una hora en el tanque antes del muestreo. Para el estrés repetido se realizaba la misma operación después de 24 horas. Para el estrés crónico se utilizó un modelo de estrés por densidad (entre 30-50 kg/m 3 , dependiendo del experimento, comparado con las densidades habituales de 8-10 kg/m 3 .

Los experimentos sobre infección experimental se realizaron utilizando un modelo de inyección intraperitoneal de Lipopolisacárido de membrana (LPS) de Escherichia coli a la concentración de 8mg/kg y específicamente en doradas con 2x10⁸ bacterias de *Pseudomonas anguilliseptica* por pez (con un peso de pez de 200g), por ser un patógeno oportunista en esta especie.

Experimentos in vitro:

En estos experimentos se partía de poblaciones celulares de dos tipos: Una primera de células indiferenciadas de tipo monocito/macrófago extraídas del riñón anterior. Una vez extraído el riñón, se filtraba a través de una malla fina y se centrifugaba el filtrado después de una preparación de Ficoll. La segunda población celular se obtenía a partir de las células anteriores, las cuales se habían cultivado durante cinco días, cambiando el medio cada día, dando una célula tipo macrófago, claramente diferenciado.

Muestreo:

Para la sangre, plasma o suero se capturaron los peces y se colocaron rápidamente en una solución letal de anestésico (fenoxietanol). Una vez desaparecía la movilidad se extraía la sangre mediante una jeringa hipodérmica en los vasos caudales. Toda esta operación se realizaba en un tiempo menor a los 3 minutos contados desde el momento de la captura, para evitar los cambios en los niveles hormonales o inmunológicos.

Para las células, se abría a continuación el pez por la zona ventral y se extraía el tejido renal anterior, el cual era filtrado tal como se indica anteriormente. Análisis:

Se realizaron diferentes análisis en función de los experimentos aunque se determinaban los siguientes parámetros: En plasma se analizaron los niveles de cortisol (por radioinmunoanálisis, (9), glucosa (por kits colorimétricos medidos en placas ELISA) y osmolaridad (por medio de un osmómetro de punto de congelación). En suero se analizaron los niveles de complemento (mediante la técnica descrita en (11), heat shock proteins, lisozima y actividad bacteriolítica. En los cultivos celulares se analizó el número de linfocitos y granulocitos (contaje con citómetro de flujo), la actividad fagocítica (por ingestión de zymosan con un fluorocromo), la tasa de apoptosis (tinción específica) y la expresión de la citoquina TNF α (mediante PCR y northern blot).

RESULTADOS

En primer lugar cabe destacar que los experimentos realizados respecto a los efectos del estrés en el sistema inmune confirman que en general el estrés tiene efectos supresores, aunque no en todos los casos. Así, se pueden determinar dos fases en la respuesta inmune a un agente estresante. En primer lugar una fase inicial de respuesta muy rápida y de corta duración con elementos reactivos de respuesta y no depresivos. Aunque existen pocos trabajos sobre esta respuesta inicial inmediata, ésta se caracterizaría por el incremento de las proteínas de fase aguda y hsp (heat shock proteins) y en la que la se detectan incrementos transitorios de proteínas C3 del sistema del complemento y lisozima (1,8) además de la sobreexpresión de una serie específica de genes implicados. Después de esta respuesta inicial la respuesta al estrés ya suele aparecer como respuesta depresiva o supresiva. En este sentido existen multitud de trabajos demostrando estos efectos usando modelos variados de agentes estresantes distintos, desde contaminantes en el agua hasta diferentes tipos de manipulaciones relacionadas con la acuicultura, captura, transporte, confinamiento, altas densidades, relaciones de dominancia, baja calidad de agua, etc. (8,12,13,14). También es relevante reseñar que no solamente los estreses del tipo manipulación o densidad, más conocidos, generan inmunodepresión, sino que otros factores menos conocidos como pueden ser las deficiencias en la dieta también producen procesos de inmunodepresión (5,6,7).

Los trabajos de varios autores indican que el cortisol tiene efectos diferentes dependiendo de la célula estudiada y el proceso o el tiempo en el que se determinan las respuestas (tabla 1). Los estudios realizados en nuestro laboratorio reafirman la hipótesis del cortisol como modulador de la respuesta inmune. En experimentos sobre células tipo MAP (monocyte adherent potential) que desarrollarán capacidad y actividad fagocítica en el riñón anterior, se puede trabajar en condiciones de células indiferenciadas, con morfología de tipo monocito, o diferenciadas después de cultivarlas 5 días. obteniendo una morfología tipo macrófago, con prolongaciones de membrana y capacidad fagocítica. Cuando se trataron este tipo de células de trucha con una concentración de cortisol de 30 ng/ml (correspondiente a un nivel de estrés crónico suave) no se registraron cambios significativos en el número o la función de estas células. A una dosis superior (300 ng/ml) correspondiente a un nivel de estrés agudo-intenso, el cortisol hacía descender el número de células MAP en un 60%. El mismo resultado se obtuvo si se trataban las células con dexametasona en lugar de cortisol, y finalmente si se añadía el bloqueador RU486 el efecto se revertía completamente, demostrándose así que el efecto en las células era efectuado por el glucocorticoides como el cortisol. En cambio el cortisol no afectaba significativamente el número total de leucocitos del riñón anterior sino solamente estas células tipo MAP. Una observación adicional es que el seguimiento de los tipos celulares durante las

24h, 48h y 72h siguientes a la administración de cortisol indicaba que el fenotipo revertía y a las 72h las células ya volvían a mostrar el fenotipo redondeado y sin prolongaciones membranales. Las pruebas funcionales que se aplicaron a estas células (capacidad fagocítica y nivel de apoptosis) no mostraron ningún cambio significativo. Por lo tanto, el cortisol no afectó la capacidad fagocítica o la viabilidad de las células tratadas (tabla 1).

El experimento subsiguiente consistió en determinar el efecto del cortisol sobre la expresión de la citoquina proinflamatoria TNF α (Tumor necrosis factor alfa) en estas células. Para ello se trataron las células con LPS (lipopolisacárido de membrana de Escherichia coli,) a una concentración de 10 microgramos por mililitro para inducir la respuesta de expresión de TNF y se añadió cortisol. También este experimento se completó con tratamientos de dexametasona y bloqueador RU486. Los resultados indicaron que el cortisol reduce muy significativamente la expresión del TNF y por lo tanto bloquea sustancialmente la respuesta inflamatoria. El efecto de la dexametasona fue esencialmente similar al del cortisol aunque menos potente y otra vez, el efecto del cortisol era revertido cuando se añadía RU486, recuperándose así la reacción inflamatoria respecto a la citoquina TNF (tabla 1).

Tabla 1. Efectos del cortisol sobre número o función de las células inmunes en peces. PFC, células formadoras de placa (complejos con anticuerpo); MAP monocitos con potencial adherente. PT, presente trabajo.

Especie	Tejido	Célula	Variable	Efecto	Ref
Carpa Carpa Salmon Trucha Trucha Trucha Trucha Trucha	Sangre Sangre Sangre Pronefros Pronefros Pronefros Pronefros	Linfocito Granulocito Linfocito Leucocitos MAP MAP MAP	Número Número PFC Número Número Fenotipo Fagocitosis TNF	Reducción Incremento Reducción Sin cambios Reducción Reversión Sin cambios Bloqueo	13 16 1,4 1 PT PT PT

DISCUSIÓN

Aunque son varias las hormonas que interaccionan con el sistema inmune en los peces (3), la más estudiada, el cortisol, se ha planteado como inductor de esta respuesta inmunodepresiva. Los estudios realizados en esta línea demuestran que el cortisol sería más propiamente un inmunomodulador que un depresor. Así, la administración in vitro de cortisol reduce el número de linfocitos en bazo y sangre, pero al mismo tiempo aumentaría el número de granulocitos (15,16). Asimismo el cortisol reduce la capacidad fagocítica pero protege de la apoptosis en leucocitos de la sangre (10,15).

Los resultados de nuestro laboratorio también refuerzan esta hipótesis del cortisol como un mediador importante de la respuesta inmune. Nuestras investigaciones muestran que el cortisol tiene un efecto depresor de la reacción proinflamatoria pero al mismo tiempo una protección de la actividad fagocítica de los macrófagos. Ello es importante porque indicaría que algunas funciones que necesitan tiempo de procesamiento (producción de anticuerpos, proliferación celular) serían retrasadas o no-potenciadas, respecto a otras como la propia reacción fagocítica imprescindible en la lucha contra los

patógenos cuando la infección está ya presente. Por lo tanto las situaciones de estrés, en sentido amplio, incluyendo las percepciones de estrés derivadas de una infección o de una enfermedad, producen cortisol, el cual afectará al sistema inmune. Como consecuencia, el triángulo de interacciones recíprocas entre sistema nervioso, inmune y endocrino o específicamente neuroendocrino e inmune sería plenamente funcional también en los peces. En segundo lugar parece demostrarse que el cortisol no es un inmunodepresor neto, sino un inmunomodulador.

Agradecimientos

Las investigaciones que se citan en este trabajo han sido financiadas gracias a proyectos del Plan Nacional I+D (Ministerio Educación y Ciencia), y la Generalitat de Catalunya (Centre de Referència en Aqüicultura). Este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de Roger Travesset y Pilar Tudela.

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Ainsworth, A.J., Dexiang, C., Waterstrat, P.R. 1991. Changes in peripheral blood leukocyte percentages and function of neutrophils in stressed channel catfish. J. Aquat. Anim. Health, 3: 41-47
- 2. Demers, N.E. and Bayne, C.J. 1997. The immediate effects of stress and hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. Develop. Comp. Immunol. 21(4): 363-373.
- 3. Harris, J., and Bird, D.J. 2000. Modulation of fish immune system by hormones. Vet Immunol. Immunopathol. 77: 163-176
- 4. Maule, A.G., and Schreck, C.B. 1991. Stress and cortisol treatment changes the affinity and number of glucocorticoid receptors in leukocytes and gill of coho salmon. Gen. Comp. Endocrinol. 84: 83-93.
- Montero, D., Tort, L., Izquierdo, M.S., Robaina, L. and Vergara, J.M. 1998. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by alpha-tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. Fish Physiol. Biochem. 18: 399-407.
- Montero, D., Marrero, M., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Vergara, J.M. and Tort, L. 1999. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream *Sparus aurata* juveniles subjected to crowding stress. Aquaculture 171: 269-278
- 7. Montero, D., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J.M., and Izquierdo, M. 2001. Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. Fish and Shellfish Immunol. 11: 473-490
- 8. Rotllant, J., Pavlidis, M., Kentouri, M., Abad, M.E. and Tort, L.. 1997 Non-specific immune responses in the red porgy *Pagrus pagrus* after crowding stress. Aquaculture. 156: 279-290
- Rotllant, J., P.H.M.Balm, J. Pérez-Sánchez, S.E. Wendelaar-Bonga and L.Tort. 2001. Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.,Teleostei) after handling and confinement stress. Gen. Comp. Endocrinol. 121: 333-342
- Saha, N.R., Usami, T. Suzuki, Y. 2000. In vitro effects of steroid hormones on invitro-secreting cells and IgM secretion in common carp (Cyprinus carpio). Fish Shellfish Immunol.17:149-158
- 11. Sunyer, J.O. and Tort, L. 1995. Natural haemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the Alternative Complement Pathway. Vet. Immunol. Immunopathol. 45: 333-345.
- 12. Sunyer, J.O., Gómez, E., Navarro, V., Quesada, J. and Tort, L. 1996. Depression of humoral components of the immune system and

- physiological responses in gilthead sea bream Sparus aurata after daily acute stress. Can. J.Fish. Aguat. Sci. 52: 2339-2346.
- 13. Tort, L., Gómez, E., Montero, D. and Sunyer, J.O. 1995. Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocomopetence. Their suitability in stress and dietary studies. Aquaculture International. 4: 31-41.
- 14. Tort, L., Sunyer, J.O., Gómez, E. and Molinero, A. 1996. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream Sparus aurata. Vet. Immunol. Immunopathol. 51: 179-
- 15. Weyts, F.A.A. Cohen, N., Flik, G., and Verburg-Van Kemenade, B.M.L. 1999. Interactions between the immune system and the hypothalamuspituitary-interrenal axis in fish. Fish Shellfish Immunol. 9: 1-20.
- 16. Woytaszek, J., Dziewulska-Szwaijkowska, D., Lozinska-Dabska, M., Adamowicz, A., Djugaj, A., 2002. Hematological effects of high dose of cortisol in the carp (Cyprinus carpio L.). Gen. Comp. Endocrinol. 125:176-

REPRODUCCIÓN Y VITELOGÉNESIS EN INSECTOS: EL CADMIO COMO ALTERADOR ENDOCRINO POTENCIAL EN Oncopeltus fasciatus

A. Cervera, N. López-Soler, R. Martínez-Pardo, M.D. Garcerá

Dpt. Biologia Funcional i Antropologia Física, Unitat Fisiologia Animal, Universitat de València. España.

RESUMEN. El cadmio (Cd), metal de elevada toxicidad, tiene efectos negativos sobre distintos procesos fisiológicos relacionados con la reproducción de vertebrados, al actuar sobre su control endocrino. En insectos, y en concreto en *O. fasciatus*, altera el crecimiento y la reproducción, afectando negativamente la tasa de oviposición, la tasa de eclosión, la fecundidad y la fertilidad. Estos efectos sobre diferentes parámetros reproductivos pueden estar relacionados con la disminución de la síntesis de vitelogeninas en el cuerpo graso producida por el Cd, por lo que hay menos proteínas en hemolinfa para ser incorporadas a los oocitos en desarrollo. Esta acción sobre la síntesis de polipéptidos vitelogénicos no es atribuible a la actuación del metal sobre la síntesis de hormona juvenil, inductora de dicho proceso, ni al efecto conocido del Cd de disminuir de forma general la cantidad total de proteínas sintetizadas.

INTRODUCCIÓN

El cadmio (Cd) es un metal pesado tóxico, que no se encuentra libre en la naturaleza pero que contamina el ambiente, donde se acumula por acción antropogénica (1). Este metal se ha detectado en más de 1.000 especies de flora y fauna, pero no existe evidencia de que tenga ninguna función biológica. El Cd produce daños en todo tipo de macromoléculas, siendo capaz de alterar procesos celulares importantes. Es un pro-oxidante que aumenta el estrés oxidativo celular al inducir la formación de especies reactivas del oxígeno, las cuales, a su vez, producen daños en lípidos, proteínas y ADN (2-4).

El Cd causa diversas alteraciones sobre los organismos animales, tanto vertebrados como invertebrados. Entre los insectos, además de afectar a la morfología celular (5) y la composición de nutrientes (6-8), la exposición crónica al Cd produce una disminución del peso corporal (8-10), retrasos en el desarrollo, que se manifiestan con un aumento de la duración de los estadios no reproductivos (9) o con la aparición de estadios ninfales adicionales (11), y la alteración de varios parámetros relacionados con la reproducción. Entre ellos, la duración del periodo reproductor, la fecundidad y la fertilidad tienen influencia en el éxito reproductor de las especies, y generalmente se ven reducidos tras la exposición a Cd (10, 12-14).

Por otro lado, en varias especies de peces (15-17), el Cd inhibe la síntesis de vitelogeninas, un proceso controlado por el estradiol, habiéndose publicado recientemente el mecanismo de acción del Cd a nivel molecular tanto en peces (18) como en humanos (19). Todo ello nos indica la actividad alteradora endocrina producida por este metal. Sin embargo, los efectos del Cd sobre el sistema endocrino de invertebrados, y más concretamente de insectos, no se han estudiado con detalle hasta ahora, y los únicos indicios de su posible actividad alteradora endocrina provienen de su efecto sobre procesos regulados por hormonas.

En Oncopeltus fasciatus (Hemiptera, Heteroptera) y en otros insectos, la maduración ovárica, la deposición de la vema en los oocitos, la síntesis de vitelogeninas (Vg) en el cuerpo graso y su incorporación a los oocitos están controlados por la hormona juvenil (HJ) (20-24). En este insecto se han descrito dos vitelogeninas nativas, Vg A y Vg B (25), con un peso molecular de 200 y 68 kDa respectivamente (26), y cuya síntesis parece hallarse bajo el control de la HJ (24-26).

Teniendo todo esto en cuenta, en el presente trabajo se resumen los resultados obtenidos en los últimos meses sobre los efectos de la exposición crónica al Cd en la reproducción y la vitelogénesis de O. fasciatus.

Efectos del cadmio sobre la reproducción de O. fasciatus.

En un experimento de ciclo de vida completo se expuso ninfas recién eclosionadas de O. fasciatus a diferentes concentraciones de Cd. estudiándose los siguientes parámetros relacionados con la reproducción: tasa de oviposición (número de huevos puestos por hembra y día), fecundidad (número de huevos puestos por hembra durante todo el periodo reproductor), tasa de eclosión (porcentaje de ninfas eclosionadas a partir de los huevos puestos por las hembras) y fertilidad (número total de ninfas viables por hembra). El metal se administró en el agua de bebida, en las concentraciones de 10, 20, 30, 50 y 100 mg l⁻¹ Cd (14).

Los resultados obtenidos indicaron que la tasa de oviposición, la fecundidad y la fertilidad quedaban afectadas de forma importante por la exposición a concentraciones subletales de Cd, mientras que el metal también influía negativamente sobre la tasa de eclosión. La tasa de oviposición, la fecundidad y la fertilidad de las hembras expuestas sufrieron una reducción significativa a partir de la dosis más baja de Cd suministrada (10 mg l⁻¹), con descensos del 28, 42 y 45% con respecto al control, respectivamente, a la concentración mencionada. La exposición de las hembras a 30 mg Cd l⁻¹ suprimió casi por completo la producción de huevos viables (inhibición del 93% respecto al control). Por otro lado, la tasa de eclosión de los huevos puestos por hembras expuestas disminuyó proporcionalmente al logaritmo de la concentración de Cd, obteniéndose una concentración de inhibición del 50% de la eclosión de 41,2 mg l⁻¹ Cd (Tabla 1) (14).

Tabla 1. Efectos del Cd sobre la tasa de oviposición, fecundidad, tasa de eclosión v fertilidad (media±DE) de hembras de O. fasciatus¹.

mg l⁻¹ Cd	Tasa oviposición	Fecundidad	Tasa eclosión	Fertilidad
0	18,1±2,3	450,1±40,7	82,9±1,7	378,6±31,8
10	13,2±6,9	261,5±35,6	79,7±0,7	209,1±27,9
20	10,2±3,9	162,4±41,2	68,3±0,3	114,9±32,3
30	4,3±2,4	49,7±63,0	54,8±0,7	27,1±49,3
50	6,2±7,5	90,3±92,2	32,9±22,0	30,1±72,2
100	9,8	167,0	6,0	5,0

¹Datos de Cervera y cols. (14).

El efecto del Cd sobre la fecundidad no es atribuible únicamente a una menor supervivencia de las hembras expuestas al metal, demostrado anteriormente (14), sino también a la disminución de la tasa de oviposición. Por otro lado, el hecho de que la fecundidad esté correlacionada generalmente con el peso de las hembras (27), aunque no en *O. fasciatus* (21), podría hacer pensar que el efecto del Cd sobre la fecundidad se debe a una disminución del peso de las hembras. Sin embargo, a 10 mg l⁻¹ Cd este parámetro no se ve afectado todavía (14), mientras que la fecundidad se ve reducida un 40%, lo que demuestra que el efecto del Cd sobre este parámetro no se produce a través de una reducción del peso.

La reducción en la producción de gonadotropinas y hormonas sexuales en machos de vertebrados expuestos a Cd (28, 29) sugiere que la reproducción de los machos de *O. fasciatus* se puede ver afectada por el Cd, influyendo así sobra la producción de descendencia viable, aunque esta posibilidad no se ha investigado.

La tasa de oviposición y la fecundidad disminuyeron linealmente con la concentración de Cd, para aumentar a las dos concentraciones más altas ensayadas (14). La posible causa de este hecho inusual podría estar relacionada con el alimento. A las concentraciones más altas de metal se produjo una gran mortalidad ninfal (14) con lo que la disponibilidad de alimento para las ninfas supervivientes debió ser mayor, pudiendo así afectar a la descendencia, tal y como apuntan Timmermans y cols. (30).

Efectos del cadmio sobre la síntesis de vitelogeninas en O. fasciatus.

Los resultados hasta aquí expuestos indican que el Cd reduce el éxito reproductor de *O. fasciatus*, por lo que se puede decir que estos efectos son compatibles con un efecto alterador endocrino del Cd sobre este insecto (31). Si esto es así, ¿puede el Cd inhibir la vitelogénesis en las hembras, de modo similar a lo descrito en peces (16, 32), impidiendo, por tanto, la producción de huevos?

Para responder a esta pregunta, en primer lugar se procedió a identificar, mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS) (34), las proteínas vitelogénicas descritas previamente (25). Se observó que, además, en las carreras electroforéticas de hemolinfa de hembras maduras de *O. fasciatus* aparecía un tercer polipéptido vitelogénico no descrito hasta la fecha, no presente en la hemolinfa de machos, y que se incorporaba selectivamente a los oocitos en desarrollo, al igual que lo hacen las Vg A y B ya descritas (34). Se calculó un peso molecular de 172±3 kDa, intermedio entre los de las otras Vg (26), por lo que se procedió a renombrar a las Vg A y Vg B como VG1 y VG3, respectivamente, denominando al nuevo polipéptido vitelogénico VG2. Estas tres bandas electroforéticas también se encontraron en muestras de ovarios vitelogénicos, pero no se detectaron en el cuerpo graso (34).

A continuación se analizó el nivel de proteínas vitelogénicas en hemolinfa y ovarios de hembras expuestas durante cinco días a 50, 100 o 200 mg Cd l⁻¹ en el agua de bebida, clasificando también los ovarios en función de su grado de desarrollo (22). Se observó un retraso en el desarrollo ovárico proporcional a la concentración de metal, con una inhibición completa de la maduración ovárica a la dosis más alta de Cd. Al mismo tiempo se observó una disminución en la concentración de los dos polipéptidos vitelogénicos mayoritarios de *O. fasciatus*, VG1 y VG2, tanto en hemolinfa como en ovarios, proporcional a la concentración de Cd. La concentración de Cd más baja ensayada produjo una disminución significativa del 50%, respecto del control,

en el contenido de VG1 y VG2 en la hemolinfa (33, 34). El hecho de que el contenido de proteína total de todas las muestras sometidas a electroforesis fuera el mismo nos indica que el efecto del Cd sobre los polipéptidos vitelogénicos es específico, y no el resultado de una inhibición general de la síntesis de proteínas (7, 35). El efecto inhibidor del Cd sobre la síntesis de vitelogeninas está bien documentado en peces (16, 32), aunque se han realizado muy pocas investigaciones similares en invertebrados (36). Por otro lado, según nuestro conocimiento, hasta la fecha no existe ningún estudio del efecto del Cd u otro metal pesado sobre la vitelogénesis de insectos.

En O. fasciatus la síntesis de vitelogeninas está controlada por la HJ (20-24). El hecho de que no se encontraran polipéptidos vitelogénicos en el cuerpo graso de hembras expuestas al Cd, ni tampoco una acumulación de VG1 y VG2 en ovarios o hemolinfa (34), indica que los procesos de secreción de estos polipéptidos por parte del cuerpo graso, o su incorporación en los ovarios, no se ven afectados por el metal. Por tanto, la disminución de los niveles hemolinfáticos de VG1 y VG2 puede deberse a una inhibición de su síntesis en el cuerpo graso, causada, a su vez, por una alteración en la secreción de HJ. Para investigar esta posibilidad se realizó una serie de experimentos en los que se inactivó la glándula productora de la hormona, el corpus allatum (CA), mediante tratamiento con precoceno II (PII) (37) o por privación de alimento (20). De esta forma podía comprobarse si estos efectos eran similares a los producidos por la administración de Cd. Por otro lado, se realizó una terapia de sustitución con HJ, tanto en insectos privados de alimento como tratados con Cd, para comprobar si, efectivamente, la hormona era capaz de restaurar los niveles de VG1 y VG2.

El tratamiento de hembras recién emergidas (0-10 h) de O. fasciatus con PII no proporcionó resultados muy homogéneos, ya que en dos de las cuatro réplicas realizadas se observó hembras vitelogénicas, detectándose ligeramente las VG1 y VG3, y en mayor proporción la VG2. Este último polipéptido también se detectó en una de las cuatro réplicas del grupo al que, además de tratarlo con PII, se le administró 50 mg l⁻¹ Cd (33, 34). Estos resultados indican que el tratamiento con PII no inactivó completamente el CA. De hecho, el PII induce cambios degenerativos en el parénquima del CA que pueden ser más o menos drásticos en función de la actividad de la glándula (38), por lo que es posible que algunas células del CA de las hembras tratadas con PII sean capaces de producir HJ.

Por otro lado, la privación de alimento tuvo un efecto drástico sobre el contenido de polipéptidos vitelogénicos en la hemolinfa de hembras de 5 días de edad, no detectándose ninguno de ellos en dichas hembras, aunque sí apareció una pequeña concentración en la hemolinfa de hembras expuestas a 50 mg I⁻¹ Cd.

Estos resultados parecen indicar que los efectos causados por el Cd se deben a una alteración en la producción de HJ. Para comprobarlo se aplicó tópicamente 10 µg de HJ I a hembras expuestas a 50 mg I⁻¹ Cd durante 7 días. Esta terapia de sustitución no aumentó sustancialmente los niveles de polipéptidos vitelogénicos en relación a otras proteínas hemolinfáticas, encontrándose valores de VG1 y VG2 en hemolinfa de hembras tratadas con Cd y con HJ por debajo de los de hembras control o tratadas sólo con HJ (33, 34), por lo que la inhibición de la síntesis de polipéptidos vitelogénicos en las hembras expuestas a Cd no está causada por una disminución en la producción de HJ. Se sabe que el Cd puede inhibir, indirectamente, la síntesis de HJ y de su ácido en larvas y pupas de Manduca sexta (39) y en machos adultos de lepidópteros (40), al actuar como inhibidor competitivo de los

canales de calcio del CA. Sin embargo, no existen estudios que demuestren un efecto directo del Cd sobre la síntesis de HJ en insectos.

Por otro lado, los efectos del Cd sobre la síntesis de polipéptidos vitelogénicos podrían ser debidos a una reducción en la ingesta de alimentos o en la asimilación de nutrientes, y no a un efecto directo del metal sobre la síntesis de vitelogeninas. Para descartar esta posibilidad se aplicó tópicamente 10 µg de HJI a hembras privadas de alimento o expuestas a Cd durante 7 días. Esta terapia incrementó la concentración de VG1 y VG2 en hembras privadas de alimento hasta niveles similares a las de las hembras control, mientras que en las hembras expuestas a Cd no se observó efecto alguno (33, 34). Estos resultados indican que la falta de alimentación y la exposición al Cd inhiben la síntesis de Vg por mecanismos diferentes.

Todos estos resultados, en conjunto, muestran que la diana del Cd está situada por debajo de la HJ en el modelo de control de la vitelogénesis en *O. fasciatus*, apuntando a que el Cd podría inhibir la síntesis de polipéptidos vitelogénicos en el cuerpo graso a través del bloqueo del receptor de la HJ en este órgano. De hecho, se ha descrito que en el pez *Oncorhynchus mykiss* el Cd se une al receptor de estrógenos en el hígado, inhibiendo la transcripción del gen de la vitelogenina (18). La similitud de efectos causados por el Cd en ambas especies hace pensar que el mecanismo de acción del metal en *O. fasciatus* sería similar al descrito para *O. mykiss*.

Aunque los resultados aquí presentados no son concluyentes respecto al mecanismo de acción del Cd en *O. fasciatus*, existen evidencias suficientes para calificar a este metal como alterador endocrino potencial en este insecto. Para demostrar de forma irrefutable este papel haría falta demostrar que el Cd se une al receptor de la HJ del cuerpo graso e inhibe la transcripción del gen o genes de las vitelogeninas. Por desgracia, todavía no se ha identificado de forma definitiva al receptor o receptores de la HJ en insectos (41-44).

Agradecimientos

A. Cervera agradece la beca predoctoral concedida por la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana. Este trabajo ha sido realizado gracias a los proyectos PB-94-0962 de la DGICYT y GV2001-394 de la Generalitat Valenciana.

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Pacvna JM. Scholtz MT. Li YF. Environ Rev 3: 145-159, 1995.
- Sarkar S, Yadav P, Trivedi R, Bansal AK, Bhatnagar D. J Trace Elements Med Biol 9: 144-149. 1995.
- 3. Mikhailova MV, Littlefield NA, Hass BS, Poirier LA, Chou MW. Cancer Letters 115: 141-148. 1997.
- 4. Cervera A, Maymó AC, Martínez-Pardo R, Garcerá MD. *Environ Entomol* 32: 705-710. 2003.
- 5. Pawert M, Triebskorn R, Graff S, Berkus M, Schulz J, Kohler HR. *Sci Total Environ* 181: 187-200. 1996.
- 6. Ortel J. Comp Biochem Physiol 112C: 291-298. 1995.
- 7. Ortel J. Bull Environ Contam Toxicol 55: 216-221. 1995.
- 8. Ortel J. Environ Toxicol Chem 15: 1171-1176. 1996.
- Schmidt GH, Ibrahim NMM, Abdallah MD. Sci Total Environ 107: 109-134. 1991.
- 10. Fountain MT, Hopkin SP. Ecotoxicol Environ Saf 48: 275-276. 2001.
- 11. Gintenreiter S, Ortel J, Nopp HJ. Arch Environ Contam Toxicol 25: 62-66.

- 12. Postma JF, Buckert-de Jong MB, Staats N, Davids C. Arch Environ Contam Toxicol 26: 143-148. 1994.
- 13. Raina RM, Pawar P, Sharma RN. Indian J Exp Biol 39: 78-81. 2001.
- 14. Cervera A, Maymó AC, Martínez-Pardo R, Garcerá MD. J Insect Physiol 50: 737-749. 2004.
- 15. Haux C, Bjornsson BT, Forlin L, Larsson A, Deftos LJ. Mar Environ Res 24: 199-202. 1988.
- 16. Povlsen AF, Korsgaard B, Bjerregaard P. Aquatic Toxicol 17: 253-262. 1990.
- 17. Pereira JJ, Mercaldo-Allen R, Kuropat C, Luedke D, Sennefelder G. Arch Environ Contam Toxicol 24: 427-431. 1993.
- 18. Le Guével R, Petit FG, Le Goff P, Métivier R, Valotaire Y, Pakdel F. Biol Reprod 63: 259-266. 2000.
- 19. Stoica A, Katzenelenbogen BS, Martin MB. Mol Endocrinol 14: 545-553.
- 20. Johansson AS. Nature (London) 174, 89. 1954.
- 21. Johansson AS. Nytt Mag Zool 7: 1-132. 1958.
- 22. Kelly TJ, Davenport R. J Insect Physiol 22: 1381-1393. 1976.
- 23. Kelly TJ, Hunt LM. J Insect Physiol 28: 935-941. 1982
- 24. Martínez T, Garcerá MD. Arch Insect Biochem Physiol 6: 49-58. 1987.
- 25. Kelly TJ, Telfer WH. Develop Biol 61: 58-69. 1977.
- 26. Rankin MA, Jäckle H. J Insect Physiol 26: 671-684. 1980.
- 27. Honek A. Oikos 66: 483-492. 1993.
- 28. Kime DE. Toxicol Letters 22: 83-88. 1984.
- 29. Lafuente A, Cano P, Esquifino A. Biometals 16: 243-250. 2003.
- 30. Timmermans KR, Peeters W, Tonkes M. Hydrobiologia 241: 119-134.
- 31. Ingersoll CG, Hutchinson T, Crane M, Dodson S, DeWitt T, Gies A, Huet MC, McKenney CL, Oberdörster E, Pascoe D, Versteeg OW. En: Endocrine Disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing and Assessment. SETAC Press, pp. 107-197. 1999.
- 32. Olsson PE, Kling P, Petterson C, Silversand C. Biochem J 307: 197-203. 1995.
- 33. Cervera A, López-Soler N, Martínez-Pardo R, Garcerá MD. 5º Congreso de la AIEC. Faro (Portugal). 2005.
- 34. Cervera A, Maymó AC, Martínez-Pardo R, Garcerá MD. J Insect Physiol 51: 895-911. 2005.
- 35. Norton KB, Kench JE. Environ Res 13: 102-110. 1977.
- 36. Scaps P, Britel M, Fabre MC, Gerard S, Descamps M. Bull Soc Zool Fr Evol Zool 123: 43-51. 1998.
- 37. Bowers WS, Martínez-Pardo R. Science 197: 1369-1371. 1977.
- 38. Unnithan GC, Nair KK, Bowers WS. J Insect Physiol 23: 1081-1094. 1977.
- 39. Allen CU, Janzen WP, Granger NA. Mol Cel Endocrinol 84: 227-241. 1992.
- 40. Hsieh YC, Hsu EL, Chow YS, Kou R. Arch Insect Biochem Physiol 48: 89-99. 2001.
- 41. Wyatt GR. European J Entomol 94: 323-333. 1997.
- 42. Feyereisen R. Proc Nat Acad Sci USA 95: 2725-2726. 1998.
- 43. Davey KG. Insect Biochem Mol Biol 30: 663-669. 2000.
- 44. Schooley DA, Tobe SS, Jagi KJ. J Insect Physiol 51: 343. 2005.

GENOMIC DUPLICATION AND EVOLUTIVE DIVERGENCE OF FISH GROWTH HORMONE RECEPTORS. PHYSIOLOGICAL IMPLICATIONS FOR GROWTH HORMONE AND SOMATOLACTIN MEDIATED EFFECTS

J.A. Calduch-Giner, A. Saera-Vila, J. Pérez-Sánchez

Departamento de Biología, Cultivo y Patología de Especies Marinas, Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), Castellón, España.

ABSTRACT. The somatotropic axis plays a pleiotropic action in higher and lower vertebrates, being very sensitive to pollutant exposure and changes in season and nutritional status. In practice, this can be used as a useful marker of fish growth and welfare. Thus, in the context of a UE Project (PEPPA: QLRT-2000-30068), we have found that total fish meal replacement by plant protein mixtures increases the degree of glycosylation of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP) in rainbow trout. This fact increases the half life of IGFBP-3, which then decreases the availability of free IGFs (bioactive fraction) without changes in the total amount of circulating IGF-I. By contrast, in gilthead sea bream, the replacement of fish meal by plant proteins decreases in a progressive manner the total amount of circulating levels of IGF-I. This endocrine derangement is primarily due to a reduced expression of hepatic growth hormone receptors (GHR), which does not happen in rainbow trout. These differences between species reveal different critical steps in the nutritional regulation of somatotropic axis, which emphasizes the need to consider in detail all the components of this endocrine cascade. In this regard, a major advance in the field of fish growth endocrinology has been the cloning and sequence of the turbot GHR. After this, GHRs have been cloned and sequenced in other non-salmonid fish, including gilthead sea bream and European sea bass. The genomic organization of these GHRs reveals a high degree of conservation of the exon-intron organization, although an exclusive fish intron (10/10A) is found in fish species. In most of them, this intron is spliced out, but in others (black sea bream) the intron 10/10A is alternatively spliced, giving a long GHR isoform with a short insertion in the intracellular region. In several salmonid fish, the GHR has also been cloned and sequenced, showing this receptor several different structural features in comparison to the GHR firstly described in non-salmonid fish (GHR type I). Several authors have speculated about a divergent evolution of fish GHRs, but recent work indicates that GHR is duplicated in the genome of trout and perciform fish. This has been confirmed by the screening of genomic libraries of gilthead sea bream and searches for sequence similarity in genome data bases of fugu and zebrafish. Regarding the physiological significance of these two fish GHRs, it is of interest that GHR type II (firstly described in salmonids) is an exclusive receptor of growth hormone (GH), whereas GHR type I would work as a GH and somatolactin (SL) receptor. Nevertheless, GH and SL have often an opposite regulation, and we have hypothesized that in vivo these two pituitary proteins of GH/PRL family do not compete in a reliable manner for GHR type I. In agreement with this, in gilthead sea bream, most of the stimulatory effects of GH in hepatic and extra-hepatic IGF expression are related to the up-regulation of GHR type I rather than to GHR type II. Additional and promising work is now underway in order to identify different cis-regulatory elements in the promoter region of fish GHRs.

Growth hormone receptor overview

Pituitary growth hormone (GH) is essential for growth in lower and higher vertebrates, affecting also lipid and carbohydrate metabolism. At the tissue level, this pleiotropic action results from the interaction of GH with specific cell surface receptors that triggers different post-receptor signalling systems. In consequence, the ability of GH to exert a specific biological effect is intimately linked to the number and function of GH receptors (GHRs) in target tissues.

GHR belongs to the haematopoietic receptor superfamily, which includes among others the receptors of prolactin, leptin, erytropoietin, hematopoietin, granulocyte colony stimulating factor, the interferons and interleukins. Most of these receptors, as well as GHR, mediate cellular effects via ligand-induced receptor dimerization, and all of them contain one or two pairs of positionally conserved cysteines and two regions of

homology to the Type III module of fibronectin. A WSXWS (tryptophan, serine, any amino acid, tryptophan, serine) motif is present in all the members with the exception of IL-7 and GHR, in which this motif is conserved as an analogous aromatic-S/G-X-aromatic-S sequence (Fig. 1). Expression of GHR takes place at varying levels in

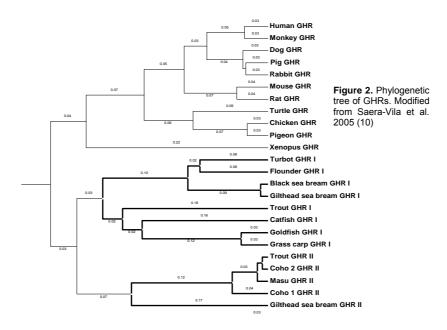
Figure 1. Structure of GHRs. Extracellular (white) and intracellular (black) domains, disulphide bounds (-), FGEFS (-), box 1 (■) and box 2 (III) motives are

many tissues and cell types. The factors governing this process remain to be resolved, but it appears that the use of alternate promoters in conjunction with different splicing plays a major role in orchestrating a tissue-specific profile of GHR expression. Heterogeneity in the 5' untranslated region (5' UTR) of GHR mRNA is in fact a well documented phenomenon in many species of mammals. Thus, for the human GHR gene, up to nine GHR mRNA variants (V1-V9) that splice into the same site just upstream of the translation start site in exon 2 are reported (1). Within the mammalian genome several genes have multiple 5'UTR exons, but the level of complexity of mammalian GHR gene is a distinctive feature. This seems to be appropriate for a protein involved in several physiological processes that are crucial for the survival and well-being of the organism. Therefore, as we learn more about the details and intricacies of these regulatory processes, we will be in a better position to exploit this information for the improvement and treatment of growth performance, and metabolic and nutritional disorders.

Duplication and radiation of fish GHRs

The cDNA for fish GHR was initially cloned from turbot (2) and goldfish (3). Subsequently, cDNA clones corresponding among others to gilthead sea bream (4), black sea bream (5), Japanese flounder (6), grass carp (GenBank accession AY283778), southern catfish (AY336104), coho salmon (AF403539 and AF403540), masu salmon (7), rainbow trout (8) and Atlantic salmon (AY462105 and DQ163908) have been characterized. Amino acid alignment of GHRs reveals a relative high degree of identity (35-40%) among tetrapods and non-salmonid fish with a strict conservation of the FGEFS ligand-binding domain, extracellular cysteine residues, Box 1 and Box 2 domains, and

cytoplasmic tyrosine residues. Nevertheless, amino acid identity among GHRs of tetrapods and salmonids (trout, masu and coho salmon) decreases up to 27-34% with a lack of three conserved cytoplasmic tyrosine residues (Y1, Y3, Y6) and two extracellular cysteines (C5, C6) involved in a short disulphide link. Several authors have postulated a divergent evolution of salmonid GHRs. However, in a recent study, we have cloned and sequenced a nutritionally regulated GHR in rainbow trout, which is related to GHRs of non-salmonid fish (GHR type I) rather than to the first reported GHR of salmonid fish (GHR type II) (9). In this scenario, we searched by RT-PCR for GHR type II in fish species with a well characterized GHR type I (10). Interestingly, in trout and gilthead sea bream, a cDNA sequence with all the characteristic features of salmonid GHRs (GHR type II) was found. Similarly, in European sea bass, a cDNA encoding for the intracellular domain of GHR type II was also reported. No positive results were found in turbot, but screening of genomic libraries in gilthead sea bream clearly matches two different GHR genes. Indeed, searches in genome databases of fugu and zebrafish for sequence similarity to fish GHR type I and II identified again two different DNA sequences, which are more related each other than to GHRs of tetrapods (Fig. 2).

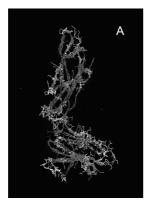


It is believed that duplication of genes and entire genomes are important mechanisms for enabling morphological and functional innovation in evolution. Thus, polyploidy has long been recognized in fish, and different genome duplications from two to six rounds have been proposed for different fish lineages. Salmonids, catastomids and some species of cyprinids are considered recent tetraploids, but phylogenetic analysis indicates a high rate of evolution for both GHR type I and type II, which suggests that duplication and radiation of fish GHRs took place on an early ancestor of fish lineages. In this regard, the lack of success for the PCR amplification of the turbot GHR type II might reflect changes in DNA sequence. However, in this and perhaps other

flatfish species, we cannot exclude that the appearance of truncated variants of GHR type I might allow the silencing or genomic loss of GHR type II. These fish truncated GHR variants comprise extracellular and transmembrane domains, the first 28 amino acids of the intracellular domain and a divergence sequence of 21-26 amino acids, which is the result of the lack of the alternative splicing of intron 9/10 (2, 6).

GH and SL specificity

Different studies with mammalian transfected cells indicate that GH specifically binds to fish GHR type I (3, 5) and type II (11). However, changes on the extracellular GHR domain, including a different pattern of N-glycosylation and disulphide bonds, can be perceived as a different physical interaction of the ligand with its receptor (see Fig. 3). According to this, detailed binding studies with recombinant derived GHR receptors from salmonid fish indicate that the binding affinity of GHR type I [also called SL receptor by Fukada and coworkers (12)] is higher for SL than for GH. In contrast, GHR type II appears to be conserved through the evolution and radiation of teleosts as a specific GHR (7). The physiological significance of this finding remains to be established, but on the seasonal and nutritional basis GH and SL often exhibit an opposite regulation (13, 14, 15). We have argued, therefore, that these two closely related pituitary hormones do not compete in a reliable manner for GHR type I in vivo. Indeed, GH and SL also differ in their metabolic and growth-promoting effects. Thus, recombinant preparations of fish GH and SL exert a lipolytic effect in gilthead sea bream. However, GH promotes feed intake and hepatic IGF production, whereas SL decreases in a transitory manner feed intake and do not enhance growth or hepatic IGF production (15, 16). This different biological outcomes can result from different ligand-receptor interactions, but we cannot exclude that different signaling pathways are activated upon binding of GH and SL by GHR type I, as it has been established in mammals for insulin receptors and IGF and insulin ligands (17).



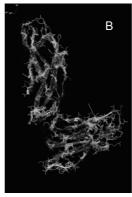


Figure 3. 3D modelling of gilthead sea bream GHR type I(A) and type II (B). Swissmodelling server at (http://swissmodel.expasy.org/S WISS-MODEL.html).

Genomic organization and analysis of the 5'flanking region

The exon-intron organization of GHRs shows a high degree of conservation through the evolution of higher and lower vertebrate species. Thus, the gilthead sea bream GHR type II spans more than 14 kb with eight coding exons homologous to exon 2 and exons 4-10 of the human GHR gene. Exon 2 encodes the signal peptide and 9 bp of the 5'UTR, exons 4-7 encode the hormone-binding domain, exon 8 encodes the transmembrane domain and 17 bp of the intracellular domain, and exons 9 and 10 code for the remainder of the intracellular domain (943 bp) and 3' UTR. A similar genomic organization has been reported for the GHR type I in gilthead sea bream, turbot and Japanese flounder (6, 10, 14). In this case, however, a short and exclusive fish intron (10/10A), not alternatively spliced in black sea bream, has been found within exon 10 of sparidae and flatfish (14).

At the present time, there is no experimental evidence for fish GHR variants that differ in the 5'UTR. Thus, refined mapping by RML-RACE identifies a single transcription start site for GHR type I and type II in liver, adipose tissue and skeletal muscle of gilthead sea bream. This transcription start site was located by screening of Genome Walker libraries, coding the leader exon (exon 1) for a 5'UTR sequence located more than 5 kb upstream exon 2 (Fig. 4). For both genes, analysis of the 5'proximal region does not reveal a consensus TATA box that could define a transcription start site. However, the sequence surrounding the start site contains sequence elements that are similar to the consensus sequence for the initiator element (Inr), a DNA sequence that defines the transcription start site in many TATA-less promoters of eukaryotes (18).

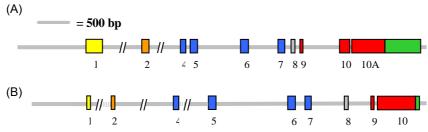


Figure 4. Schematic representation of genomic organization of GHR type I (A) and type II (B) of gilthead sea bream.

Additional regulatory elements along the 5'flanking region (1-1.5 kb) are retrieved using the MatInspector program. The highest score is found for nuclear factor Y (NFY), cAMP-responsive element binding protein (CREB), POU domains and activating factors (Oct-1, Brn-2, USF), myogenic factors (MyoD, MyF5, MEF2), skeletal and developmental factors (TBX5, AREB6, Gfi), haematopoietic and oncogenic factors (MEL1, Ikaros-1, AML1,c-Myb, NERF1a, HIF-1, AP, c-ETS-1), anti-oncogenic factors (p53, Wilms tumor supressor), Aryl hydrocarbon receptor (Aryl/Arnt heterodimers), estrogen receptors (ER, ERR), and sterol regulatory binding protein (SREBP). At present, it is difficult to infer a different pattern of regulation for GHR type I and type II. However, a highest concentration of regulatory elements is clearly found in GHR type I, which indicates perhaps a more complex and sophisticated regulation. Overall, the expression of GHR type I is also higher than GHR type II, which agrees with the observation that hepatic and extrahepatic IGF expression in response to changes in season and age is correlated to GHR type I rather than to GHR type II. However, an opposite pattern was found after confinement exposure. These observations suggest that, after duplication, gene pairs of fish GHRs adopted a subfunctionalization, rapidly enough to escape disabling mutations that would lead their eradication in the genome of most of the modern fish species.

Acknowledgements

This research was funded by EU (Q5RS-2000-30068; "Perspectives of Plant Protein Use in Aquaculture", PEPPA) and Spanish (AGL2002-00551 and AGL2004-06319-C02-01) projects.

REFERENCES

- 1. Goodyer CG, Zogopoulos G, Schwartzbauer G, Zheng H, Hendy GN, Menon RK 2001 Endocrinology 142: 1923-1934.
- 2. Calduch-Giner JA, Duval H, Chesnel F, Boeuf G, Pérez-Sánchez J, Boujard D 2001 Endocrinology 142: 3269-3273.
- 3. Lee LTO, Nong G, Chan YH, Tse DLY, Cheng CHK 2001 Gene 270: 121-
- 4. Calduch-Giner JA, Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S, Boujard D, Pérez-Sánchez J 2003 Comp Biochem Physiol 136B:1-13.
- 5. Tse DLY, Tse MCL, Chan CB, Deng L, Zhang WM, Lin HR, Cheng CHK 2003 Biochim Biophys Acta 1625: 64-76.
- 6. Nakao N, Higashimoto Y, Ohkubo T, Yoshizato H, Nakai N, Nakashima K, Tanaka M 2004 J Endocrinol 182: 157-164.
- 7. Fukada H, Ozaki Y, Pierce AL, Adachi S, Yamauchi K, Hara A, Swanson P, Dickhoff WW 2004 Gen Comp Endocrinol 139: 61-71.
- 8. Very NM, Kittilson JD, Norbeck LA, Sheridan MA 2005 Comp Biochem Physiol B 140: 615-628.
- 9. Gómez-requeni P, Calduch-Giner JA, Vega-Rubín de Celis S, Médale F, Kaushik SJ, Pérez-Sánchez J 2005 Br J Nutr (In press.)
- 10. Saera-Vila A, Calduch-Giner JA, Pérez-Sánchez J 2005 Gen Comp Endocrinol 142: 193-203.
- 11. Benedet S, Johansson V, Sweeney G, Galay-Burgos M, Björnsson BT 2005 Fish Physiol Biochem (in press.)
- 12. Fukada H, Ozaki Y, Pierce AL, Adachi S, Yamauchi K, Hara A, Swanson P, Dickhoff WW 2005 Endocrinology 146: 2354-2361.
- 13. Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S, Astola A, Pendón C, Martínez Valdivia M, Pérez-Sánchez J 2002 Endocrinology 128:102-111.
- 14. Pérez-Sánchez J. Calduch-Giner JA, Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S. Gómez-Requeni P, Saera-Vila A, Astola A, Valdivia MM 2002 Fish Physiol Biochem 27:243-258.
- 15. Vega-Rubín de Celis S, Rojas P, Gómez-Requeni P, Albalat A, Gutiérrez J, Médale F, Kaushik SJ, Navarro I, Pérez-Sánchez J 2004 Comp Biochem Physiol 138A:533-542
- 16. Vega-Rubín de Celis S, Gómez P, Calduch-Giner JA, Médale F, Pérez-Sánchez J 2003 Mar Biotechnol 5:92-101
- 17. Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE 2005 Cytokine Growth Factor Rev 16:421-439
- 18. Smale ST 1997 Biochim Biophys Acta 1351: 73-88.

AVANCES EN LA REGULACIÓN HORMONAL DE LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL Y DE LA PUBERTAD DE LA LUBINA EUROPEA

M. Carrillo, S. Zanuy, G. Molés, A. Felip, B. Muriach, E. Mañanós, J.M. Cerdá-Reverter, I. Begtashi y L. Rodríguez

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

RESUMEN. En los teleósteos existen dos períodos críticos del proceso reproductor: 1) la época en que adquieren la capacidad de diferenciarse hacia uno u otro sexo, y 2) el período durante el cual pasan de juveniles inmaduros a adultos capaces de producir gametos por primera vez. Estos dos períodos, conocidos como diferenciación sexual y pubertad, respectivamente, ocurren en una época muy concreta de la vida característica de cada especie. Ambos procesos están regulados hormonalmente y son influenciados por el medio ambiente externo. Desgraciadamente, en los peces existen grandes lagunas en el conocimiento de la regulación hormonal de estos dos procesos. La posibilidad de generar, por selección de tamaños, poblaciones de un sexo determinado, desde etapas muy tempranas de la vida y la de inhibir el primer desarrollo gonadal, por aplicación de fotociclos, han permitido estudiar el eje cerebro-hipófisis-gónada de la lubina en circunstancias óptimas para esclarecer algunos de los mecanismos endocrinos asociados a estos periodos. Ello proporciona un recurso prometedor para abordar el estudio del control hormonal y ambiental de la diferenciación sexual y de la pubertad de los peces y aporta conocimientos fundamentales y de aplicación en acuicultura.

INTRODUCCIÓN

La diferenciación sexual es un proceso de cinética muy diversa en los peces, durante el cual la gónada pasa desde un estado indiferenciado a otro de diferenciación ovárica o testicular. La diferenciación sexual aparece en una etapa muy concreta de la ontogenia del pez y es característica de cada especie. Este proceso que requiere de una regulación hormonal específica del eje cerebro-hipófisis-gónada (CHG), es muy plástico y puede ser alterado por la administración exógena de hormonas o por factores ambientales. Desgraciadamente, el conocimiento de los mecanismos hormonales y ambientales que regulan la diferenciación sexual es escaso y se limita a muy pocas especies de teleósteos. Averiguar que factores ambientales están implicados en la activación de la diferenciación sexual, cual es el mecanismo de traducción de estos factores a nivel cerebral v cómo se efectúa la regulación de la cascada hormonal en el eje CHG, es clave para entender y controlar este proceso. En el aspecto aplicado, el control del dimorfismo sexual permite cultivar monosexos con características diferenciales de interés. La pubertad ocurre algún tiempo después de la diferenciación sexual. En este periodo los juveniles inmaduros se convierten en adultos maduros al desarrollar la primera espermatogénesis u ovogénesis con éxito. Ambos culminan en la producción de los gametos, adquiriendo así la capacidad de reproducirse por primera vez en su vida. El tiempo de aparición de la pubertad depende de la especie. Los salmónidos, espáridos o morónidos, la alcanzan a

los 2-3 años, en cambio, los meros o los esturiones lo hacen un poco más tarde (4-7 años). Además, dentro de una misma especie, los sexos presentan diferencias temporales en el inicio de la pubertad. Por ejemplo los machos de lubina, lenguado, trucha y salmón llegan a ella a los dos años. Pero las hembras lo hacen un año mas tarde. Todavía no se conoce con exactitud, cuales son los factores ambientales y hormonales implicados en el inicio de la pubertad de los teleosteos, ni tampoco los mecanismos biológicos subyacentes. Se ha sugerido que deberían existir un tamaño, acumulación de reservas grasas o estatus energético críticos, permisivos del inicio de la pubertad de peces juveniles y que la leptina, sintetizada por los adipocitos, podría ser la señal hormonal que indicase al CHG cuando se debe iniciar este proceso. Desgraciadamente aun no se ha podido demostrar la existencia de leptina en peces y las evidencias de su participación son fragmentarias e indirectas. El conocimiento de los mecanismos implicados en la pubertad tiene, a la vez, interés científico y práctico. En aquellas especies cuya comercialización se realiza alrededor del tiempo de la pubertad, interesa atrasarla para que el animal no diversifique energía en el crecimiento gonadal. En otras especies, en las que se comercializan las gónadas y la época de la pubertad es tardía, interesa adelantarla. Además, en la casi totalidad de los cultivos intensivos de peces, de interés comercial, como espáridos, morónidos o salmónidos, se da una pubertad anticipada o maduración precoz que puede afectar a un 20-100% de la población. Estos animales precoces, crecen menos, son más susceptibles a enfermedades y son difíciles de comercializar, originando grandes pérdidas económicas al sector. Las causas de la precocidad son menos conocidas que las que rigen el inicio de la pubertad, pero todo parece girar alrededor de la activación del eje CHG. La lubina, un teleósteo marino de gran importancia en acuicultura, ha sido nuestro modelo para estudiar el control endocrino de la diferenciación sexual y de la pubertad. A lo largo de esta revisión explicaremos algunos mecanismos implicados en el control endocrino de la diferenciación sexual, en poblaciones previamente seleccionadas por sexos (mayoritariamente macho o PM y mayoritariamente hembra o PH), mediante la evaluación de los niveles de los factores liberadores hipotalámicos (GnRHs) y su receptor (dlGnRH-R-2A) y de las gonadotrofinas (GTHs; FSH y LH). Por otra parte, describiremos los últimos avances en el control de la pubertad y su regulación endocrina, en lubinas foto-estimuladas en las que, por una parte, se indujo un retraso del inicio de la pubertad por aplicación de fotoperíodos largos (FL) y por otra, una inhibición de la precocidad mediante la aplicación de luz continua (24 h luz día-1; LL).

MATERIAL Y MÉTODOS

<u>Diferenciación sexual</u>. Se utilizaron varios miles de larvas eclosionadas y alevines de lubina, obtenidos de puestas naturales y seleccionados por tamaño, de entre los 2 y 8 meses después de la eclosión (DDE). Así, a los 300 (DDE) se tenian dos poblaciones, una de individuos grandes y otra de pequeños, con una proporción de 96,5% hembras (PH) y 69,2% machos (PM), respectivamente. Durante el periodo de selección ambas poblaciones se muestrearon cada 50 días y se recogieron cerebros, hipófisis y sangre. Se analizaron las niveles de mRNA de varios genes (GnRHs, dlGnRH-R-2A, α GP, β FSH y β LH), por PCR semi-cuantitativo y se determinaron los niveles de GnRHs en cerebro e hipófisis y LH en cerebro y plasma por EIA. (1). Control de la pubertad. Estos estudios se hicieron con 160.447 juveniles de lubina de 11,4 g distribuidos en 4 jaulas flotantes (125 m³), dos de ellas mantenidas a fotoperiodo largo (FL) (18 horas de luz 6 horas de oscuridad) y

dos a fotoperiodo natural (FN), hasta la pubertad (2 años). Se recogieron muestras mensuales de gónadas, hipófisis y sangre, y se determinaron los niveles de sbGnRH, LH y esteroides sexuales por EIA.

<u>Inhibición de la precocidad</u>. Para ello se utilizaron 3000 alevines de lubina de 4 g de peso repartidos en 4 tanques de 2000 l, dos expuestos a luz continua (24 h luz día⁻¹; LL) y otros dos a fotoperiodo natural (CN), durante un año consecutivo. Se muestrearon mensualmente y se evaluó el crecimiento somático y gonadal hasta el final de la primera maduración tentativa (2). A la vez se recogieron muestras de gónadas, hipófisis y sangre, y se determino la expresión de las sub-unidades de las gonadotropinas por dot-blot y los niveles de sbGnRH, LH y esteroides sexuales por EIA (3).

RESULTADOS

Diferenciación. Tanto el sbGnRH como el sGnRH mostraron picos de expresión en cerebro al tiempo de la diferenciación sexual, que en las hembras tuvo lugar a los 150 DDE y en los machos a los 200 DDE. A su vez, se observó una evolución paralela de los niveles de expresión del dIGnRH-R-2A, la $GP\alpha$ y la $FSH\beta$ en hipófisis. Los niveles de sbGnRH en cerebro también mostraron dimorfismo sexual. Mientras que en PH se observó una elevación progresiva desde los 150 DDE hasta los 250 DDE, en PM los niveles de sbGnRH fueron bajos hasta los 200 DDE y se elevaron a los 250 DDE. Además, al tiempo de la diferenciación sexual de las hembras (150 DDE) y a los 200 DDE, los niveles de sbGnRH en cerebro fueron significativamente mayores en PH que en PM. En cambio, los niveles de sbGnRH y de sGnRH en hipófisis, presentaron una evolución inversa a los del cerebro. Es decir, altos al inicio de la diferenciación sexual (150 DDE) y bajos en fechas posteriores. Finalmente, se observó una elevación progresiva y paralela de la expresión de LHβ y de los niveles de LH en hipófisis y en plasma desde los 150 DDE hasta el término de la experiencia, en ambos grupos experimentales. Al final de la diferenciación sexual (250 DDE) PH presentó niveles de LH en hipófisis y en sangre significativamente (P<0,05) mas elevados que PM. Además, en PH los niveles plasmáticos de LH experimentaron una elevación drástica sólo al término de la diferenciación sexual. Asimismo, en PH, esta hormona, en lugar de aumentar progresivamente como en PM, experimentó un drástico descenso a los 300

Control de la pubertad. El FL indujo una aceleración significativa del crecimiento durante los períodos de desarrollo gonadal tentativo (DGT) al primer año y de la pubertad al segundo. En los peces expuestos a FN, la evolución del IGS fue muy discreta durante el DGT, alcanzando un pico en el mes de Marzo. Los testículos estaban en estadios madurativos poco avanzados y no se observaron animales precoces (espermiantes). Los peces expuestos a FL, durante este mismo período, tuvieron un IGS más elevado que los de FN, con un pico en el mes de Abril y presencia de animales precoces (3%). Durante la pubertad el IGS de los peces expuestos a FN, presento un perfil normal con un pico en Febrero (3) y con un 80% de animales fluyentes. Sin embargo, en aquellos peces expuestos a FL, el pico se alcanzó un mes mas tarde (Marzo) y el IGS y la proporción de animales fluyentes fueron más elevados. El contenido de sbGnRH en hipófisis no presentó diferencias entre los dos grupos, pero los niveles de LH en plasma de los peces mantenidos a FL fueron significativamente (P<0.05) mas elevados que los de FN, particularmente durante el DGT y la pubertad. Además, aquellos mostraron un retraso, en la fase del ritmo, de un mes con

respecto a los del FN, en ambos períodos. De manera similar, los niveles plasmáticos de 11KT de FL fueron significativamente (P<0.001) mas elevados que los de FN durante el DGT y la pubertad. Así mismo, se observó un desfase de un mes en la fase de sus ritmos. Los niveles plasmáticos de testosterona mostraron una evolución diferente presentando niveles significativamente más bajos en el grupo expuesto a FL en relación con FN. Inhibición de la precocidad. El LL provocó una reducción importante del IGS (≤0,2%), frente a los controles (CN) que alcanzaron valores del 1% en Febrero durante el DGT. El porcentaje de animales precoces fue del 22 % en el grupo CN y prácticamente nulo en LL. Además, en el grupo LL se observó una inhibición completa de la expresión de las sub-unidades GP α , FSH β y LH β en hipófisis. Sin embargo, el tratamiento con luz continua no afectó ni al contenido de LH en hipófisis, ni a sus niveles en plasma, siendo iguales a los de los controles. El tratamiento con luz continua afecto de manera significativa a los niveles de 11KT testicular y plasmática que fueron muy bajos en comparación con los de los controles.

DISCUSIÓN

El hecho de que exista un tiempo diferente para el inicio de la diferenciación sexual de machos y hembras, presupone que su regulación endocrina también debería refleiar este dimorfismo temporal. Ello facilita la identificación de factores endocrinos cuyos patrones de variación evolucionan en paralelo con la temporalidad de este proceso. En este sentido, dos de las tres formas de GnRH presentes en la lubina, la tipo dorada (sbGnRH) y la tipo salmón (sGnRH) exhibieron dimorfismo sexual en sus niveles cerebrales de expresión y contenido, así como en los hipofisarios, coincidiendo además, con el inicio y la duración del periodo de diferenciación sexual en esta especie. Por otra parte, la expresión de estas dos formas guardó una estrecha correlación, tanto en machos como en hembras, con las variaciones de expresión del dIGnRH-R-2A indicando la activación de la transcripción de gonadotropinas, durante este período, por activación del receptor. Los resultados obtenidos demostraron que únicamente la expresión de las sub-unidades $GP\alpha$ y $FSH\beta$ presentaron un pico de actividad coincidente con el inicio de la diferenciación sexual en ambos sexos. En cambio, tanto la expresión de la LHß en hipófisis, como los niveles de LH en hipófisis y en plasma incrementaron progresivamente durante el DGT alcanzando los valores mas elevados al final de este período. En síntesis, esto nos permite lanzar una hipótesis sobre el posible mecanismo endocrino que estaría operando en la diferenciación sexual de la lubina: Al comienzo de la diferenciación sexual, se pondría en marcha un proceso de síntesis en cerebro, liberación y transporte y acumulación en hipófisis, tanto del sbGnRH como del sGnRH, que al activar a su receptor (sbGnRH-2A) en la hipófisis, regularían la expresión génica y posiblemente la síntesis y la liberación de la FSH, durante este período. Esta hipótesis se vería apoyada por los altos niveles de estradiol encontrados a los 200 DDE en PH (4) y por los niveles más elevados de Aromatasa B en hembras que en machos, al tiempo de la diferenciación sexual. Este patrón revierte en etapas más avanzadas en las cuales los machos, exhibieron niveles de expresión de esta enzima más elevados que los de las hembras

En las lubinas mantenidas en jaulas flotantes, la exposición a FL se mostró muy eficaz para atrasar la pubertad, induciendo además una aceleración del crecimiento que fue más patente durante el DGT y el período de pubertad. Esta aceleración del crecimiento se atribuyó al retraso del desarrollo gonadal durante estos dos períodos. Como la comercialización de la lubina se efectúa alrededor del momento de la pubertad, la ganancia en peso en los animales foto-estimulados, producida por el retraso de la pubertad, implicaría una clara ventaja económica para el acuicultor. El desfase de un mes en la evolución del IGS, observado entre ambos grupos experimentales, también se produjo en los ritmos anuales de los niveles plasmáticos de LH y 11KT. Además, los niveles hormonales del grupo FL fueron significativamente más elevados que los del grupo FN. Ello se traduce en mayor desarrollo y maduración gonadal, así como en un incremento del porcentaje de precoces en el grupo fotoestimulado. Todos estos hechos nos permiten enunciar la siguiente hipótesis: La señal fotoperiodica (FL) llegaría al cerebro, a través de la glándula pineal y los ojos laterales, donde tendría lugar su traducción electrofisiológica y hormonal que a su vez, afectaría a los niveles de síntesis y liberación de GnRH y a la unión a su receptor a nivel hipotalámico. Esto condicionaría la liberación al plasma de la LH hipofisaria de dos maneras: Afectando a la amplitud del ritmo (incremento de los niveles en plasma) y a la fase del mismo (retraso). Por otro lado y considerando que los procesos fisiológicos están regulados por una cascada hormonal que se produce a lo largo del CHG, la secreción rítmica de LH también estaría afectando a la producción de esteroides gonadales, de forma rítmica, más específicamente a la producción de 11KT. Esto explicaría que el retraso de la pubertad de la lubina, inducido por FL, esté en función del retraso de la fase de la producción y liberación, rítmica al plasma, tanto de la LH como de la 11KT. La aceleración del crecimiento, observado en los animales expuestos a FL, sería consecuencia del retraso de la pubertad que permitiría dirigir los recursos energéticos al crecimiento somático, antes que al gonadal. El mayor desarrollo gonadal, el incremento de la precocidad y la maduración de los ejemplares, estarían en función de la mayor amplitud del ritmo tanto de la LH como del 11KT que resultaron afectados por el FL. Finalmente la 11-KT actuaría a nivel testicular para estimular la gametogénesis y espermiación y presentaría procesos de retroalimentación negativa a nivel hipofisario para regular la secreción de LH dado que los picos de 11KT, en plasma, preceden a los de LH.

En los meses subsiguientes a la de diferenciación sexual del macho de lubina. se inicia una proliferación gonadal activa que da paso a las divisiones meióticas, iniciándose así la gametogénesis. Este período ha sido denominado periodo de desarrollo gonadal tentativo (DGT) (2). Además, este proceso culmina con la producción de esperma, aunque sólo en una determinada proporción de la población, dando lugar a la aparición de machos precoces. En el caso de los animales expuestos a fotoperiodo natural (CN), el porcentaje de precoces fue del 22%. La exposición a LL durante el primer año de vida, partiendo de alevines de 5 meses de edad, prácticamente eliminó la presencia de machos precoces. La drástica reducción del tamaño testicular y de los estadios más avanzados de desarrollo gonadal tuvo su contrapartida hormonal en una fuerte reducción de los niveles de expresión de las subunidades de las gonadotrofinas hipofisarias. Ello indica que la LL afectó, de manera contundente, a la transcripción de los genes $GP\alpha$, $LH\beta$ y $FSH\beta$. Sin embargo, ni el contenido de LH en hipófisis, ni sus niveles en plasma se vieron afectados. Ello nos sugiere que la regulación de la síntesis de LH en hipófisis es diferente de la de su liberación. Probablemente esté indicando que se está produciendo una síntesis nueva, en hipófisis, a expensas de un mRNA ya existente en la célula. Por otro lado, se abolieron por completo, tanto la acumulación de 11 KT en gónada (que fue máxima en los controles al inicio del DGT), como sus niveles en plasma (que en los controles incrementaron hasta alcanzar un pico al final del DGT). Estos resultados nos permiten concluir que la 11KT es el candidato más firme como causa de la precocidad en la lubina. En consecuencia, los niveles de acumulación de 11-KT en gónada y su liberación en plasma, serían determinantes en el desarrollo y maduración testicular y el motivo de la aparición de machos precoces. Actualmente, se está estudiando si, durante la ontogenia del animal, existen ventanas temporales de sensibilidad a luz contínua capaces de inhibir el DGT y por tanto la precocidad. Los resultados que son muy prometedores, indican que el período sensible puede ser de corta duración y con una localización muy específica. Además, se está experimentando con animales fotoestimulados (LL), tratados con esteroides sexuales, con el fin de desbloquear los efectos inhibidores de la luz continua. Es posible que en un plazo de tiempo razonable, podamos comprender, de manera más precisa, los mecanismos hormonales y ambientales implicados en inicio de la pubertad de la lubina.

Agradecimientos

Estos trabajos fueron financiados por los proyectos nacionales: 1FD1997-1699-CO2-02/MAR; AGL2002-10024; AGL2002-12470-E y europeos: QLRT-2001-01801, Q5R-2000-31365.

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Molés G, Carrillo M, Mañanós E, Mylonas D, Zanuy S. 2005. Temporal profile of brain and pituitary GnRH-R and gonadotropin m-RNA expression and content during early development in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). Biol. Rep. (en consideración).
- 2. Begtashi I, Rodríguez L, Moles G., Zanuy S, Carrillo M. 2004. Long-term exposure to continuous Light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (Dicentrarchus labrax L). I. Morphological aspects. Aquaculture 241:539-559.
- 3. Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M. 2005. Long term exposure to continuous light inhibits precocity in European male sea bass (Dicentrarchus labrax L.). Hormonal aspects. Gen. Comp. Endocrinol. 140:
- 4. Papadaki M., Piferrer F, Zanuy S, Maingot E, Divanach P, Mylonas C. 2005. Growth, sex differentiation and gonad and plasma levels of sex steroids in male-and female-dominant populations of *Dicentrarchus labrax* obtained through repeated size grading. J. Fish Biol. 66:938-956.
- 5. Piferrer F, Blázquez M, Navarro L, González A. 2005. Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (Dicentrarchus labrax L.). Gen. Comp. Endocrinol. 142: 102-110.

EFFECTS OF AGONIST AND ANTAGONIST OF THE COMPONENTS OF THE STEROIDOGENIC PATHWAY LEADING TO MALE AND FEMALE SEX DIFFERENTIATION IN THE SEA BASS (Dicentrarchus labrax)

L. Navarro-Martín, C. Castel, M. Blázquez, F. Piferrer

Dpt. Recursos Marins Renovables, Institut de Ciències del Mar, CSIC. Barcelona, Spain.

ABSTRACT. Undifferentiated sea bass were exposed *per* os (doses in mg Kg⁻ food) to: methyldihydrotestosterone (MDTH; 10); estrogen, estradiol-17β (E₂; 10); aromatase inhibitor, fadrozole (Fz; 100); anti-androgen, cyproterone acetate (CPA; 100) and anti-estrogen, tamoxifen (Tx; 100). Chemicals were dissolved in ethanol and then administered between two different periods: from 131 to 191 dpf (days post fertilization) in one preliminary experiment, experiment 1 (Exp.1), and from 90 to 150 dpf in experiment 2 (Exp.2). Controls were exposed to ethanol only and had 67.5% females in Exp.1 and 26.3% females in Exp.2. In both periods, MDHT and E2 resulted in all-male and allfemale stocks. This confirms that sea bass can be fully masculinized or feminized by exposure to an androgen or estrogen, respectively. AR gene expression levels increased from 150 to 200 dpf in all but the MDHT group, suggesting that early exposure to an androgen down-regulates AR gene expression levels in males. Treatment with Fz reduced females to an average of 2.5% and, unlike MDHT, did not affect AR gene expression, indicating that the masculinizing effect of Fz is not due to a direct interaction with AR but most likely due to a lack of E2 necessary for ovarian differentiation. Tx had an unexpected estrogenic effect (100% females) when administered in Exp.2 but had no effect (30.8% females) when administered in Exp.1. These results could be due to the doses used and because, despite being designed as an ER blocker, Tx is capable of eliciting estrogenic effects at such doses. CPA reduced the number of males in Exp.1, but did not affect gene expression levels in Exp.2. To clarify the effects of steroid blockers on sex differentiation, effects of Tx and CPA need further investigation.

INTRODUCTION

The European sea bass is a gonochoristic species without sexual dimorphism. Gonadal differentiation takes place when animals reach a minimum size (8-12 cm) regardless of age (1), which means that, under standard culture conditions, the first histological signs of sex differentiation do not start before 200 dpf. In the sea bass, sex is determined by genotype-environmental interactions (8). Clear parental influences are combined with the effects of temperature during the larval rearing period. Sex steroids are involved in fish gonadal sex differentiation (9). The aromatase enzyme (responsible for the conversion of androgens into estrogens) and, consequently, 17β-estradiol (E₂) are implicated in ovarian differentiation. The aim of the present study was to gain a better understanding of the steroidogenic pathway leading to male vs. female sex differentiation by stimulating or inhibiting certain components associated with this pathway. For this reason fish were treated with 17βestradiol and 17α-methyldihidrotestosterone (as "positive" controls), expecting female and male biased sex differentiation, respectively. Treatments with fadrozole had the objective to inhibit aromatase. The other two treatments,

tamoxifen and cyproterone acetate, were designed to block the union between the steroids and their correspondent receptors. It is known that tamoxifen, a type I anti-estrogen, produces changes in the tertiary structure of the protein complex of the estrogen receptor (ER). However, once the complex blockerreceptor is formed, the receptor may remain partially active (5,6), and thus capable to induce both anti-estrogenic and estrogenic effects. Hence, effects of tamoxifen are very complex. For example, in Alligator mississippiensis, tamoxifen sex-reverses embryos at male producing temperatures, but acts as an anti-estrogen in female hatchlings (5). On the other hand, in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss, and in tilapia, Oreochromis niloticus, no masculinization effect was observed following treatments of tamoxifen in all-female populations (2). The action of the anti-androgen CPA is also complex. Inhibition of oogenesis and spermatogenesis occurred in the Japanese medaka (Oryzias latipes) after CPA treatments (4). Although CPA acted as a potent antiandrogen in Bufo bufo adults, in larvae it caused a paradoxal masculinization of the gonads (7). These cases illustrate that the effects of steroid blockers are very variable and depending on the species or even the developmental stage or the tissue target within a single species.

MATERIAL AND METHODS

Undifferentiated sea bass were exposed per os to (doses in mg Kg⁻¹ food): a synthetic androgen, methyldihydrotestosterone (MDTH; 10); estrogen, estradiol-17β (E₂; 10); aromatase inhibitor, fadrozole (Fz; 100); anti-androgen, cyproterone acetate (CPA; 100) and anti-estrogen, tamoxifen (Tx; 100). Controls were exposed to ethanol only. Chemicals were dissolved in ethanol and incorporated into pelleted dry food. Two experiments were carried out with two different genetic origins. Fish were fed ad libitum from 131 to 191 dpf in a preliminary experiment, experiment 1 (Exp.1) and from 90 to 150 dpf in experiment 2 (Exp.2). Rearing conditions and the number of available fish in Exp.1 were limited (26 fish/tank). The treatments were repeated in Exp.2 (190 fish/tank), whose treatment period coincided with the labile period of highest sensitivity to exogenous steroids. P450aromA (ARO) and Androgen Receptor (AR) gene expression levels were measured at 150 and 200 dpf in Exp.2. At 410 dpf (Exp.1) and at 320 dpf (Exp.2) fish were sacrificed and standard length (cm), body weight (g) and gonadal weight (g) were determined. In the case of Exp.1 also visceral fat and liver weight (g) and length of left and right gonads were determined.

RESULTS

Fish in the control group of Exp.1 died because of problems with the fish holding facilities. No differences on standard length (cm), body weight (g) and survival between the remaining treatments were found at the time of sacrifice. In Exp.1, visceral fat indices (VFI), hepatosomatic indices (HSI) and differences in right vs left gonads did not have any significative difference between treatments. Therefore these indices were not measured in Exp.2. Regarding sex ratios, controls had 26.3% females in Exp.1 and 67.5% females in Exp.2. These differences reflect differences in the genetic origins of the broodstock used to generate the fish used in each experiment. In both experiments, MDHT and Fz resulted in essentially all-male stocks (95-100% males), while E2 treatment resulted in 100% females. Tx had clear feminizing effect (100% females) when administered at 90-150 dpf (Exp.2) but had no effect (30.8% females) in Exp.1. Administration of CPA significatively reduced the number of males in Exp.1.

P450aromA gene expression levels at 150 and 200 dpf were clearly bimodal, with low levels in presumptive males and high levels in presumptive females. Differences in P450aromA levels were later corroborated when sex could be histologically assigned. As expected, P450aromA gene expression levels were highly related to phenotypic sex, with significantly (P<0.001) higher levels in females than in males at both 150 and 200 dpf. However, AR levels were similar in both sexes regardless of treatments. No differences values in P450aromA gene expression were found among females of Ctrl, E₂, Tx and CPA treatments. In the male dominant groups resulting from MDHT and Fz treatments, both P450aromA and AR gene expression levels at 200 dpf were significantly lower in the MDHT than in Fz.

With respect to gonadal development proper, the gonadosomatic index (GSI), was determined for both experiments at time of sacrifice. No differences in the GSI of females were found among treatments in both experiments. However, the GSI of Fz males was significantly higher than that of MDHT males. Testes were classified after histological examination into four types, depending on the degree of maturation (1, lowest; 4, highest). In Exp.2, the four types of males appeared both in MDHT and Fz groups at the same proportion. Nevertheless, treatment with MDHT lowered GSI values of precocious males.

DISCUSSION

In both experiments, MDHT and E_2 resulted in all-male and all-female stocks, respectively. This confirms that sea bass can be fully masculinized or feminized by exposure to androgens or estrogens. Treatment with the potent, non-aromatizable synthetic androgen MDHT decreased P450aromA and AR gene expression levels at 200 dpf and lowered values of GSI during the first (precocious) male maturation. This suggests that early exposition to a potent androgen not only caused permanent organizational effects on the gonads (phenotypic masculinization), but also had lasting functional consequences (stimulated spermatogenesis with lower GSI) in adults. Treatment with E_2 resulted in 100% feminization in both experiments, confirming that E_2 is able to induce ovarian differentiation with no effects on gene expression. Treatments with Fz essentially resulted in complete masculinization but they did not affect AR gene expression, suggesting that the masculinization effect of Fz did not act by interaction with AR. Most likely, this masculinization effect is due to a lack of E_2 necessary for ovarian differentiation.

Despite the fact that Tx is considered as an ER blocker, this compound was capable of eliciting pure estrogenic effects in Exp.2 while had not effect when administered between 130-190 dpf. Similar results were found in Alligator *mississipensis* embryos at male producing temperatures (5), in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and in tilapia (*Oreochromis niloticus*) (2). Regarding to CPA no effects on sex ratios and on gene expression levels were found in Exp.2. Nevertheless, it reduced the number of males in Exp.1 treated from 130-190dpf, suggesting a later period of sensitivity to androgens as compared to that to estrogens, as it has been found in several species of fish. However, to clarify the effects of steroid blockers on sex differentiation, effects of Tx and CPA need further investigation.

Furthermore, incorporation of internal (promoter analysis) and external factors (temperature), that are known to regulated aromatase, in new experiments may provide further evidence and understanding of the sexual differentiation process and may clarify the implication of aromatase in this process.

Acknowledgments

Thanks are due to Elvira Martinez for fish rearing assistance and to Silvia Joly for technical assistance. Supported by MEC grant "SEXRATIO AGL-2002-02636" and CRA grant to FP. L.N. was supported by a fellowship from MEC, AGL-2002-0006.

REFERENCES

- 1. Blázquez, M., Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F., 2001. Critical period of androgen-inducible differentiation in a teleost fish, the European sea bass. Journal of Fish Biology, 58: 342-358.
- 2. Guiguen, Y., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Iseki, K., McMeel, O.M., Martin S.A.M., Fostier A., 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) and a tilapia (Oreochromis niloticus). Mol. Reprod. Dev., 54: 154-162.
- 3. Jordan V.C., 1984. Biochemical pharmacology of antiestrogen action. Pharmacol. Rev., 36:245-276.
- 4. Kiparissis, Y., Metcalfe, T.L., Balch, G.C., Metcalfe, C.D., 2003. Effects of the Antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzas latipes). Aquatic Toxicology 63: 391-403.
- 5. Lance, V.A. and Bogart, M.H., 1991. Tamoxifen "sex reverses" alligator embryos at male producing temperature, but is an antiestrogen in female hatchlings. Experimentia 47: 263-266.
- 6. Metzger D., White J., Chamban P., 1988. The human estrogen receptor functions in yeast. Nature, 334: 31-36.
- 7. Petrini, S. and Zacanti, F., 1998. The effects of aromatase and 5α reductase inhibitors, antiandrogens, and sex steroids on bidder's organs development and gonadal differentiation in Bufo bufo Tadpoles. J. Exp. Zool. 280: 245-259.
- 8. Piferrer, F., Blázquez, M., Navarro, L., González, A., 2005. Genetic, endocrine and environmental components of sex determination and sex differentiation in the European sea bass (Dicentrarchus labrax). General and Comparative Endocrinology, 142: 102-110.
- 9. Yamamoto, T., 1969. Sex differentiation. In: W.H. Hoar, D.J. Randall, E.M. Donaldson (eds.), Fish Physiology, Academic Press, New York, pp.117-

RAB18 COMO COMPONENTE CLAVE DE LA RUTA SECRETORA EN CÉLULAS NEUROENDOCRINAS

R. Vázquez-Martínez, D. Cruz-García, J.P. Castaño, M.M. Malagón

Dpto. Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba. España.

RESUMEN. La familia de proteínas Rab-GTPasas incluye un amplio número de proteínas que controlan etapas precisas del proceso de exocitosis/ endocitosis. En particular, Rab18 es abundante en tejidos endocrinos, en los que estímulos que inducen secreción hormonal aumentan también la expresión de esta GTPasa, sugiriendo su implicación en la ruta de secreción regulada. Estudios de distribución intracelular en células PC12 y AtT20 transfectadas con GFP-Rab18 muestra que, en condiciones basales, esta GTPasa se encuentra preferentemente en forma soluble en el citosol. Sin embargo, al estimular la secreción, Rab18 sufre una translocación desde el citosol hasta los gránulos de secreción, lo que sugiere su participación en el tráfico de vesículas de exocitosis. De acuerdo con esto, la sobreexpresión de Rab18 en células PC12 o AtT20 provoca una notable atenuación de la respuesta secretora inducida, por lo que Rab18 podría actuar reteniendo el transporte de gránulos de secreción hacia la membrana plasmática durante estimulaciones agudas.

INTRODUCCIÓN

Las proteínas pertenecientes a la familia de las Rab-GTPasas participan en la regulación del transporte intracelular de vesículas, de su formación y de su anclaje y fusión con diferentes compartimentos celulares, por lo que se consideran como proteínas encargadas de la organización de los sistemas de membrana intracelular (1). Hasta ahora, se han caracterizado 63 proteínas Rab diferentes, cada una de ellas aparentemente destinada a controlar un paso determinado de la ruta de tráfico de membranas, aunque aún se desconocen las funciones específicas de muchas de estas proteínas. Todas ellas presentan como característica común un dominio de unión a GTP altamente conservado donde reside su actividad GTPasa y una región de prenilación que confiere a la proteína su especificidad para la interacción con un compartimento intracelular determinado (2, 3). Así, las proteínas Rab ciclan entre un estado inactivo unido a GDP en el citosol y un estado activo unido a GTP interaccionando con una determinada membrana intracelular (2, 3).

En concreto, Rab18 es un miembro de la familia de las Rab-GTPasas poco conocido hasta el momento. Los primeros estudios sobre Rab18, realizados en células epiteliales de riñón, mostraron la localización preferente de esta proteína cerca de la membrana apical de dichas células, por lo que se sugirió que esta GTPasa podría participar en el control de la maquinaria de endocitosis apical (4). Sin embargo, el hecho de que Rab18 se encuentre en otras regiones intracelulares de células epiteliales (4) y en otros tejidos noepiteliales (5, 6) sugiere que su función no está restringida al control de la endocitosis apical sino que Rab18 podría desempeñar otras funciones dependiendo del tejido y/o del tipo celular donde se exprese. En este sentido, mediante la aplicación de la técnica de Differential Display a células melanotropas del lóbulo intermedio hipofisario que muestran grados opuestos de actividad secretora, recientemente hemos observado que la expresión de

Rab18 es mayor en melanotropas que presentan una actividad secretora reducida en condiciones basales así como en respuesta a estímulos (7). Este descubrimiento sugiere que, en el caso particular de células endocrinas, Rab18 podría formar parte de la maquinaria intracelular que controla la secreción hormonal regulada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Se utilizaron cultivos de células PC12 y AtT20 sobre placas de 35 mm o cubreobjetos de 25 mm (20.000 células/cm²). Las células se cultivaron a 37°C y 5% CO₂ en DMEM suplementado con glutamina 1 mM, 10% FBS, 10% de suero de caballo y 1% solución de antibiótico/antimicótico en el caso de las células PC12, y con glutamina 2 mM, 10% FBS y 1% antibiótico/ antimicótico en el caso de células AtT20. Tras alcanzar una confluencia del 80%, las células fueron procesadas para las diferentes determinaciones experimentales.

Análisis de la expresión génica de Rab18

Para analizar el efecto de la estimulación de la secreción hormonal sobre la expresión de Rab18, las células AtT20 fueron tratadas con hormona liberadora de corticotropina (CRH) 100 nM durante 4, 8, 16 y 24 h, y procesadas para el aislamiento de ARN mediante Trizol (Invitrogen). A continuación, se llevó a cabo la retrotranscripción de 2µg de ARN total de cada muestra siguiendo las instrucciones del kit Power Script Reverse Transcriptase (Clontech) y se estimó la cantidad de ADNc de Rab18 mediante PCR en "tiempo real" usando para ello cebadores específicos de Rab18 (5'-CCCTGAAGATCCTCATCA-TCGG-3' y 5'-CCTCTCTTGACCAGCAGTAT-CCCA-3') y del gen de referencia 18S (5'-CCCATTCGAACGTCTGCCCTATC-3' y 5'-TG-CTGCCTTCCTTGGA-TGTGGTA-3').

Análisis de la distribución intracelular de Rab18

Para estudiar la distribución intracelular de Rab18, desarrollamos un vector reportero en el que se incluyó la secuencia codificante de Rab18 en fase con la de la proteína verde fluorescente (GFP). Las células PC12 y AtT20 se transfectaron transitoriamente con el vector reportero utilizando Lipofectamine (Invitrogen) y, 24 h más tarde, las células PC12 se incubaron con KCl 53 mM y las AtT20 con CRH 100 nM durante 4 h. A continuación, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 m y se incubaron con un anticuerpo desarrollado contra la proteína marcadora de gránulos de secreción secretogranina II (8), durante 16 h a 4°C, seguido de un anticuerpo conjugado con Alexa594 (Molecular Probes). Las preparaciones se visualizaron en un microscopio confocal TCS-SP2-AOBS (Leica). A partir de las imágenes obtenidas, se examinó el grado de colocalización de los dos marcadores fluorescentes en ambas condiciones experimentales.

Análisis de la función de Rab18 en la ruta secretora

Utilizamos las propiedades de unión a la membrana plasmática e incorporación de un marcador fluorescente, el FM5-95, que permite evaluar la magnitud de procesos de endocitosis y exocitosis en células individuales vivas (9, 10). Así, las células transfectadas con GFP-Rab18 fueron incubadas con FM5-95 2 µM durante 5 min y el grado de incorporación del marcador en células individuales se evaluó en intervalos de 1 min mediante un microscopio Eclipse TE2000 (Nikon) equipado con una cámara digital C-4880-80 (Hamamatsu). Durante la monitorización, las células fueron expuestas a KCI 53 mM (PC12) o CRH 100 nM (AtT20) para comparar así la capacidad de respuesta secretora frente a un estímulo externo de células no transfectadas y de células que sobrexpresan Rab18.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la activación de la ruta de secreción sobre la expresión de Rab18 y su distribución intracelular

La incubación de las células AtT20 con CRH provocó un aumento del 80% en el grado de expresión de Rab18 tras 8 h de tratamiento, recuperándose los niveles basales durante tratamientos más prolongados. Esta observación indica la existencia de un nexo de unión entre la regulación de la secreción hormonal y la producción de esta GTPasa y sugiere la participación, directa o indirecta, de Rab18 en el control de este proceso celular. Para elucidar la función específica de Rab18 en la ruta de secreción, analizamos en primer lugar la distribución intracelular de la proteína bajo condiciones basales y de estimulación de la secreción mediante la transfección transitoria de células PC12 con GFP-Rab18 y su posterior inmunotinción con marcadores específicos de diferentes compartimentos intracelulares. En ningún caso se encontró un grado significativo de colocalización de Rab18 y los diferentes compartimentos analizados, excepto con los gránulos de secreción en los que su grado de asociación pareció depender del estado secretor de las células. Así, bajo condiciones basales, Rab18 se encuentra predominantemente difuso en el citoplasma, con la aparición de ciertas acumulaciones de fluorescencia que no colocalizan con gránulos de secreción. Sin embargo, la activación de la ruta secretora mediante la adición de K⁺ provoca una clara redistribución de Rab18, aumentando el grado de colocalización con gránulos de secreción y disminuyendo la fluorescencia citoplasmática difusa. Estos resultados sugieren que, en condiciones basales, la mayor parte de Rab18 se encuentra difusa en el citoplasma en su estado inactivo, en espera de la señal adecuada para su interacción con la membrana de los gránulos de secreción. Esta señal, que vendría determinada por la activación de la ruta de secreción regulada, induce la translocación de Rab18 desde el citosol a la membrana de los gránulos y, en consecuencia, su activación.

Para esclarecer la función específica de Rab18 en la ruta secretora, hemos estudiado la capacidad de respuesta secretora individual de células PC12 y AtT20 transfectadas frente a estímulos externos y comparado ésta con la que muestran células no transfectadas. Para ello, monitorizamos la dinámica de incorporación del marcador fluorescente FM5-95 en células AtT20 tratadas con CRH y en células PC12 expuestas a altas concentraciones de K⁺. Esta aproximación experimental proporciona información dinámica sobre la actividad secretora de células individuales y vivas en un momento determinado. Así, la actividad secretora de las células AtT20 después de la estimulación con CRH es aproximadamente un 10% menor en células que sobreexpresan Rab18 que en las normales tras 8 min en presencia del agente estimulante. Asimismo, la sobreexpresión de Rab18 en células PC12 induce un efecto similar, inhibiendo un 20% la respuesta secretora frente a un tratamiento con altas concentraciones de $K^{\scriptscriptstyle +}$. En conjunto, estos resultados indican que Rab18 reduce la capacidad de las células neuroendocrinas a responder a agentes estimuladores de la ruta de secreción regulada. probablemente dificultando la movilización de los gránulos de secreción hacia la membrana plasmática.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de CVI-139 (Junta de Andalucía. España), y BFI 2001-2007 y BFU2004-03883 (Ministerio de Educación y Ciencia, España).

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Zerial M, McBride H 2001 Rab proteins as membrane organizers. Nat Rev Mol Cell Biol 2:107-117
- 2. Seabra MC, Wasmeier C 2004 Controlling the location and activation of Rab GTPases. Curr Opin Cell Biol 16:451-457
- 3. Pfeffer S, Aivazian D 2004 Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. Nat Rev Mol Cell Biol 5:886-896
- 4. Lutcke A, Parton RG, Murphy C, Olkkonen VM, Dupree P, Valencia A, Simons K, Zerial M 1994 Cloning and subcellular localization of novel rab proteins reveals polarized and cell type-specific expression. J Cell Sci 107 (Pt 12):3437-3448
- 5. Behrends U, Schneider I, Rossler S, Frauenknecht H, Golbeck A, Lechner B, Eigenstetter G, Zobywalski C, Muller-Weihrich S, Graubner U, Schmid I, Sackerer D, Spath M, Goetz C, Prantl F, Asmuss HP, Bise K, Mautner J 2003 Novel tumor antigens identified by autologous antibody screening of childhood medulloblastoma cDNA libraries. Int J Cancer 106:244-251
- 6. Ozeki S, Cheng J, Tauchi-Sato K, Hatano N, Taniguchi H, Fujimoto T 2005 Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. J Cell Sci 118:2601-2611
- 7. Malagon MM, Cruz D, Vazquez-Martinez R, Peinado JR, Anouar Y, Tonon MC, Vaudry H, Gracia-Navarro F, Castano JP 2005 Analysis of rab18 and a new golgin in the secretory pathway. Ann N Y Acad Sci 1040:137-139
- 8. Montero-Hadjadje M, Pelletier G, Yon L, Li S, Guillemot J, Magoul R, Tillet Y, Vaudry H, Anouar Y 2003 Biochemical characterization and immunocytochemical localization of EM66, a novel peptide derived from secretogranin II, in the rat pituitary and adrenal glands. J Histochem Cytochem 51:1083-1095
- 9. Brumback AC, Lieber JL, Angleson JK, Betz WJ 2004 Using FM1-43 to study neuropeptide granule dynamics and exocytosis. Methods 33:287-94
- 10. Cochilla AJ, Angleson JK, Betz WJ 1999 Monitoring secretory membrane with FM1-43 fluorescence. Annu Rev Neurosci 22:1-10

CLONING AND EXPRESSION OF A MT1 MELATONIN RECEPTOR IN THE EUROPEAN SEA BASS (*Dicentrarchus labrax*)

P. Herrera¹, L. Besseau², S. Sauzet², G. Boeuf², J. Falcón², J.A. Muñoz-Cueto¹

¹Departament of Biology. Faculty of Marine and Environmental Sciences. University of Cádiz. Campus Rio San Pedro. E-11510 Puerto Real, Spain. ²Laboratoire Aragó, UMR 7628, CNRS-University Pierre and Marie Curie, F-66651 Banyuls sur Mer, France.

ABSTRACT. We report here the cloning and expression of a melatonin receptor in a teleost fish, the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. The sequence analysis and the phylogenetic tree indicated that the sea bass melatonin receptor cloned shares a high identity with the MT1 (Mel1a) receptor subtype of other vertebrates. The expression pattern of this sea bass MT1 receptor in the retina and visually related areas of the brain, as well as in neuroendocrine regions, cerebellum, tegmentum and hindbrain nuclei, suggests an important role of this receptor in the processing of visual information, but also in the regulation of neuroendocrine systems and behavioural/motor activity.

INTRODUCTION

Behavioural and physiological characteristics of animals change over time and many of these changes occur in a regular or rhythmic manner. Most of biological rhythms have periodicities that range from about a day (daily cycles) to a month (lunar cycles) or to a year (seasonal or annual cycles). Day-night light cycles, seasonal changes in day length and temperature provide unambiguous environmental information about time and can act as cues for behavioural and physiological changes.

In fish, development, growth, and reproduction are influenced by the daily and seasonal variations of photoperiod and temperature. Different studies indicated that the pineal gland mediates the effects of these external factors, most probably through the rhythmic production of melatonin. This hormone acts on target cells through specific transmembrane G-protein coupled receptors. Based on pharmacological, kinetic and/or sequence characteristics, three different receptor subtypes have been identified in mammals and other vertebrates: MT1 (Mel 1a) and MT2 (Mel 1b) and a putative binding site called MT3 (4). We report here the cloning and expression of a MT1 melatonin receptor in a teleost fish, the European sea bass.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Adult sea bass specimens of both sexes ranging in body length from 20-30 cm were used. Animals were kept in running water with natural photoperiod and temperature conditions and sampled in the middle of the light phase of the photocycle.

Cloning of a partial sea bass melatonin receptor

Polymerase chain reaction (PCR) amplification was accomplished on sea bass cDNA from retina and brain using degenerated primers designed to span the most highly conserved regions of the melatonin receptors. A cDNA fragment of 381bp was amplified, purified, cloned into PGEM-T vector (Promega) and sequenced using the ABI/ PRISMTM Dye-Deoxy Terminator Sequencing Ready

Reaction Kit (Perkin Elmer). From this sequence information, 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) were preformed using the Marathon cDNA amplification Kit (Clontech) with sea bass retina and brain cDNA as template. RACE products were subcloned and sequenced as it was described previously. Sequences were aligned and the phylogenetic tree was derived by using ClustalW (EMBL).

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

RT-PCR amplification was accomplished on sea bass cDNA from retina, telencephalon, hypothalamus, optic tectum, cerebellum, pituitary, ovary, testis, skeletal muscle and liver using specific sea bass melatonin receptor forward and reverse primers.

In situ hybridization

Specific antisense and sense riboprobes (381 nucleotides) from the cloned sea bass MT1 receptor were prepared using a Digoxigenin RNA Labeling Kit (Roche). Conventional non-radiactive in situ hibridization was performed in serial sections from sea bass brain and retina.

Localization of 2-[125] iodomelatonin binding sites

For autoradiography, sea bass brain serial sections were incubated in 100 pM 2- $[^{125}I]$ iodomelatonin, 100 pM 2- $[^{125}I]$ iodomelatonin plus 10⁻⁶ M melatonin, or 100 pM 2- $[^{125}I]$ iodomelatonin, plus 10⁻⁴ M GTP γ s. Autoradiographic films were developed and photographed.

RESULTS

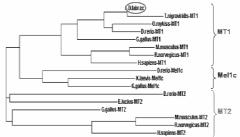
Cloning of a sea bass melatonin receptor

We have cloned a partial 922bp cDNA fragment encoding 281aa of a sea bass melatonin receptor. The sequence comparison and the phylogenetic tree indicated that the sea bass cloned belongs to the MT1 receptor subtype.

Expression of sea bass MT1 receptor.

RT-PCR study

RT-PCR analysis showed a highly expression in the retina and optic tectum, but also in other brain areas as the cerebellum. telencephalon, hypothalamus and in peripheral tissues as the testis, ovary and skeletal muscle.



In situ hybridization

Telencephalic expression of the sea bass MT1 receptor was observed in the ventral (Vv, Fig. 1A) and supracommissural (Vs) nuclei of the ventral telencephalon, but also in the dorsal (Dd) and dorsomedial subdivision 2 (Dm2, Fig. 1B) of the dorsal telencephalon. The expression of the sea bass MT1 receptor in the preoptic area (POA) was evident in the parvocellular part of the parvocellular preoptic nucleus (NPOpc, Fig. 1D) and in the suprachiasmatic nucleus (NSC, Fig. 1C). The thalamus exhibits MT1 receptor-expressing cells in the central posterior nucleus (CP, Fig. 1F) and the ventromedial nucleus (VM), whereas hypothalamic MT1 receptors appeared in cells of the ventral (NLTv) and dorsal (NLTd) subdivisions of the lateral tuberal nucleus (Fig. 1E). The periventricular gray zone (PGZ) of the optic tectum, as well as the torus longitudinalis, contains abundant MT1 receptor-expressing cells (Fig. 1G). The pretectal area contains many MT1 receptor-expressing cells (Fig. 1F) in the parvocellular part of the superficial pretectum (PSp), the dorsal part of the periventricular pretectum (PPd), the central pretectal nucleus (NPC) and the accessory pretectal nucleus (AP). Both the anterior (NGa) and posterior (NGp) subdivisions of the glomerular nucleus express MT1 receptors (Figs. 1H,I). A conspicuous MT1 receptor expression was also detected in the torus semicircularis (TS) and the oculomotor nucleus (nIII) of the mesencephalic tegmentum. The large Purkinje-like cells of the cerebellum also express MT1 receptors (Fig. 1K). In the hindbrain, MT1 receptors were detected in cells of the trigeminal nucleus (Vm, Fig. 1L) and in the reticular formation (RM, Fig. 1J).

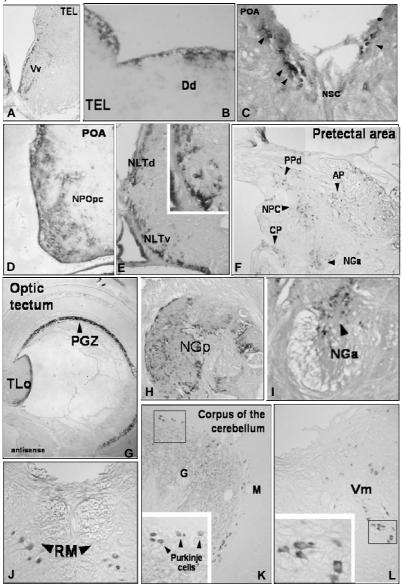


Figure 1. MT1 receptor expression in telencephalic (A,B), preoptic (C,D) and hypothalamic (E) regions, pretectum (F), optic tectum (G), glomerular nucleus (H,I) and hindbrain (J, K, L) of the European sea bass brain. *In situ* hybridization.

Localization of 2-[125] iodomelatonin binding sites in sea bass brain Autoradiographic study revealed a widespread distribution of brain melatonin binding sites, providing highly consistent results with in situ hybridization.

DISCUSSION

In the present study, we have cloned a partial cDNA sequence corresponding to a sea bass melatonin receptor. The sequence analysis showed a high identity with other melatonin receptors: 94-97% with fish MT1 receptors, 87% with chicken MT1 receptors, 72-79% with mammalian MT1receptors, 72-79% with mammalian MT1 receptors, 67-70% with Mel1c receptors from zebrafish, Xenopus and chicken, 68-69% with fish MT2 receptors, and 59-61% with mammalian MT2 receptors. This fact, together with our phylogenetic analysis, shows that the sea bas melatonin receptor cloned belongs to the MT1 (Mel1a) subtype (2; 4). The mRNA expression of this MT1 receptor was studied in sea bass by RT-PCR and in situ hybridization and results were compared with the distribution of brain 2-[125] jodomelatonin binding sites in sea bass and other teleost species (3). The results obtained confirm the widespread distribution of melatonin binding sites in the brain and provide detailed information on the localization of melatonin receptor-expressing cells in this species. MT1 receptors were mainly expressed in the retina and visually related areas, such as the pretectum, optic tectum, torus longitudinalis, glomerular complex and thalamus. Some of these areas also contain extensive pinealofugal and/or retinofugal projections (1), suggesting an important role of these regions in the processing of photoperiodic information. Furthermore, MT1 receptors were evident in the ventral telencephalon, preoptic area (including the suprachiasmatic nucleus) and hypothalamus, but also in the cerebellum, tegmentum and hindbrain. At least in mammals, it has been proposed that this melatonin receptor subtype mediated the reproductive and circadian responses (5). The pattern of distribution of this sea bass melatonin receptor also suggests a role of MT1 receptor in the regulation of neuroendocrine systems and circadian behavioural/motor activity in sea bass.

Acknowledgments

Supported by MCYT (AGL2001-0593-C03-02), Marie Curie Training Program (EU), IFREMER (752887/00; 753447/00) and Junta de Andalucía (A34/02).

REFERENCES

- 1. Ekström P, Östholm T, Holmqvist B. 1994. Primary visual projections and pineal neural connections in fishes, amphibians and reptiles. In Møller M, Pévet P Eds. Advances in Pineal Research. Vol 8. London: J Libbey, pp. 1-18.
- 2. Gaildrat, P., Falcon, J. First cloning and functional characterization of a melatonin receptor in fish brain: a novel one? 2002. J. Pineal Res. 32:74-84.
- 3. Mazurais, D. Brierley, I. Anglade, I. Drew, J. Randall, C. Bromage, N. Michel. D. Kah, O. Williams, L.M. 1999. Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. J. Comp. Neurol. 409:313-324.
- 4. Reppert SM, 1997. Melatonin receptors: molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. J. Biol. Rhythms 12(6):528-531.
- 5. Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T. 1994. Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. Neuron 13:1177-1185.

VARIACIÓN DEL PERFIL DE PROTEÍNAS PRESENTES EN EL PLASMA SEMINAL DURANTE EL PERIODO DE ESPERMIACIÓN DE LA ANGUILA EUROPEA Y RELACIÓN CON PARÁMETROS DE CALIDAD

D.S. Peñaranda 1 , M.P. Viudes de Castro 2 , D.L. Garzón 1 , L. Pérez 1 , J.S. Vicente 3 , M. Jover 1 , J.F. Asturiano 1

¹Grupo de Investigación en Recursos Acuícolas. Dpto. Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia. España. ²Centro de Investigación y Tecnología Animal. IVIA. España. ³Grupo de Mejora Animal. Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción. Universidad Politécnica de Valencia.

RESUMEN. La espermatogénesis en anguila europea se induce con la inyección intraperitoneal semanal de gonadotropina coriónica humana (hCG). Se administraron diferentes tratamientos en busca de un protocolo que proporcionara los mejores resultados reproductivos. Una vez establecido el protocolo, se estudió la posible coincidencia entre los niveles de proteínas totales en plasma seminal y los distintos parámetros. Así, se encontró una relación entre las concentraciones más altas de proteínas seminales con los niveles más altos de motilidad, supervivencia y morfometría de la cabeza de los espermatozoides.

INTRODUCCIÓN

La anguila europea ha sufrido una dramática reducción en sus poblaciónes, debido a la sobreexplotación pesquera y a la contaminación y alteración de su hábitat (1). Esta es la razón por la que se han realizado estudios para su reproducción en cautividad. Estudios previos en anguila japonesa, mostraron que repetidas inyecciones de hCG inducen la maduración sexual de machos inmaduros y la producción de esperma (2). En la anguila europea, se ha comprobado que el mismo tratamiento es útil para obtener esperma en cantidad y de calidad (3).

Las proteínas del plasma seminal han sido objeto de estudio en varios trabajos. En mamíferos se ha comprobado que proteínas presentes en el plasma seminal interaccionan con los espermatozoides, influyendo posiblemente en la maduración (4). En peces, en concreto en la lubina, se cree que dos proteínas presentes en el plasma seminal, pueden ser responsables, al menos parcialmente, de la motilidad espermática (5).

Los objetivos del experimento se dividieron en dos: a) administrar distintos tratamientos para optimizar el protocolo de inducción hormonal de la espemiogénesis, buscando un mayor número de espermiantes, mayor calidad espermática y aumentar el tiempo de espermiación, y b) comprobar si la cantidad de proteína total presente en plasma influye en alguna de las características del esperma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y tratamientos

Los animales fueron cedidos por la empresa Valenciana de Acuicultura S.A. Un total de 48 machos, fueron divididos en 6 acuarios. Las dosis elegidas se basaron en el trabajo publicado por Pérez et al. (2000) (3), que empleó una dosis intraperitoneal semanal de 1.5 U.I. hCG/g pez. Para optimizar el proceso

se probó a reducir la dosis, o mantenerla y cambiar los intervalos de adminitración. Así, los distintos tratamientos fueron:

- a) Una inyección semanal de 1.5 U.I. hCG/g pez
- b) Una invección semanal de 0.75 U.I.hCG/g pez
- c) Una inyección semanal sólo hasta el inicio de la espermación de 1.5 U.I. hCG/g pez
- d) Una invección cada dos semanas de 1.5 U.I. hCG/g pez
- e) Una inyección semanal sólo en las tres primeras semanas de tratamiento de 1.5 U.I. hCG/g pez
- f) Una invección semanal de suero fisiológico

En las muestras de esperma obtenidas semanalmente con los distintos tratamientos se midió:

Osmolaridad, pH, volumen, densidad

La osmolaridad del plasma seminal se calculó con un osmómetro, Osmomat 050 (mOsm /kg).

La densidad del esperma, diluidas las muestras 1:1000 o 1:10000, fue determinada con un hemocitómetro Thoma y expresada espermatozoides x109 /ml -1. El pH fue medido con un pHmetro GLP22, Crisol. Por último el volumen se midió en tubos Falcon graduados de 15 ml.

Motilidad y cantidad de proteína total

La motilidad fue medida a través de un programa informático de análisis de imagen, Sperm Class Analyzer (Imagesp, Barcelona). El análisis se realizaba calculando el número de células móviles respecto al total de células. La cantidad de proteína total se midió con el método colorimétrico Bradford.

Supervivencia celular y morfometría de la cabeza del espermatozoide La morfometría de la cabeza de los espermatozoides fue analizado mediante un programa informático de análisis de imagen, Sperm Class Analyzer, Morfo Version 1.1 (Imasgesp, Barcelona). Los parámetros medidos fueron el ancho, largo, área y perímetro de la cabeza del espermatozoide. La supervivencia se calculó con la tinción fluorescente Hoechst, la cual penetra en las células

muertas debido a la pérdida de la integridad de la membrana. En ambos caso, morfometría y supervivencia, se analizaron 100 células por muestra.

RESULTADOS

Los tratamientos A y D (1.5 U.I. hCG/g pez una vez por semana y una vez cada dos semanas), proporcionaron un mayor número de animales espermiantes, mayor tiempo de espermiación y mayor calidad espermática, por lo que fueron consideraros los protocolos adecuados. Como las diferencias entre ambos tratamientos no fueron significativas, se optó por considerar los resultados de ambos de forma conjunta, aumentando de esta forma el número de datos por semana. Así pues, teniendo en cuenta las muestras de estos dos tratamientos, los resultados fueron:

Cantidad de proteína total presente en plasma

Durante las tres primeras semanas de espermiación (5-7) el nivel de proteína total fue muy bajo (≈ 2 mg/ml), pero a partir de la semana 8, la cantidad de proteína se triplicó. En el resto de semanas, los valores oscilaron pero sin diferencias significativas.

Osmolaridad, pH, volumen, densidad

No se observaron diferencias significativas en pH, volumen, densidad y osmolaridad. Los valores obtenidos por los animales en una misma semana fueron muy dispares, por lo que el intervalo de confianza fue alto. Esta pudo ser la razón por la que las diferencias entre las semanas no fueran significativas. A pesar de ello, los valores no fueron muy dispares a lo largo de las semanas.

Motilidad, supervivencia, morfometría

La motilidad en las tres primeras semanas de producción espermática fue prácticamente nula, pero a partir de la semana 8 esta fue aumentando.

La supervivencia también fue significativamente mayor en las semanas 8 a 11, respecto al resto de semanas.

También en este mismo periodo la cabeza de los espermatozoide resultó significativamente más grande, que en el resto de semanas.

DISCUSIÓN

El tratamiento que mejores resultados dio fue el A, 1.5 U.I. hCG/g pez. Aunque las diferencias no fueron significativas con el tratamiento D, el primero causó un periodo de espermiación más largo y, por tanto, el número de muestras de esperma fue más elevado.

Respecto a la relación entre la cantidad de proteína total en el plasma seminal y las características seminales, se comprobó que pH, volumen, densidad y osmolaridad no presentaban correlación con el perfil de proteína total obtenido. Por tanto las proteínas seminales no parecen tener un efecto importante sobre ninguno de estos parámetros.

Sin embargo, no sucede lo mismo con la motilidad, supervivencia celular y la morfometría de la cabeza del espermatozoide. La motilidad al inicio fuemuy baja, aumentando en la semana octava, aunque las diferencias no fueron significativas debido, al menos en parte, a la falta de uniformidad de datos obtenidos en las semanas de tratamiento. El aumento en número de células móviles coincidió con el de proteína total.

La supervivencia fue superior al 50% (5-12 semanas), aunque en las semanas 8-11 fue superior al 60%, siendo estadísticamente diferentes al resto de semanas.

Por último, el tamaño de la cabeza de los espermatozoides, fue significativamente más grande durante las semanas comprendidas entre la 8 y la 11.

Existe una coincidencia entre el aumento de la motilidad, supervivencia y morfometría de la cabeza del espermatozoide con el aumento de la cantidad de proteína total. Diversos estudios sugieren un posible papel de las proteínas seminales en la protección de los espermatozoides. Un ejemplo son los trabajos en criopreservación de esperma, donde la adición de FBS (en anguila japonesa, comunicación oral, Ohta) o lecitina (6) en el medio de congelación, aumentan la supervivencia celular postcongelación. En lubina se cree que las proteínas presentes en el plasma seminal pueden condicionar la motilidad espermática (5), y en mamíferos se ha sugerido que existen algunas proteínas que podrían afectar a la maduración de los espermatozoides (4).

Los resultados obtenidos sugieren que en anguila europea las proteínas presentes en el plasma seminal, podrían tener alguna influencia en la calidad

espermática, por lo que sería de gran interés en un futuro: la caracterización de las proteínas seminales y descubrir su posible influencia en la reproducción, además de una posible aplicación en criopreservación.

Agradecimientos

Subvencionado por la la Generalitat Valenciana (GV04A-508 y FPI de DSP), la Universidad Politécnica de Valencia y el Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2003-05362-C02-01, incluyendo fondos FEDER). JFA cuenta con un contrato Ramón y Cajal cofinanciado por las dos últimas instituciones.

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Feunteun et al. (2002). Management and restoration of European eel population (Anguilla anguilla): An impossible bargain. Ecological Engineering 18, 575-591.
- 2. Ohta et al. (1997). Artificial induction of maduration and fertilization in the Japanese eel, Anguilla japonica. Fish Physiology and Biochemistry 17, 163-169
- 3. Pérez et al. (2000). Induction of maduration and spermation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. Journal of Fish Biology 57, 1488-1504.
- 4. Nixon et al. (2002). Rabbit epididymal secretory proteins. III. Molecular cloning and characterization of the complementary DNA for REP38. Biology of Reproduction 67, 147-153.
- 5. Zilli et al. (2005). Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. Biology of Reproduction 72, 1262-1267.
- 6. Asturiano et al. (2005). Physio-chemical characteristics of seminal plasma and development of media and methods for the cryopreservation of European eel sperm. Fish Physiology and Biochemistry. In Press.

FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF PACAP RECEPTORS FROM SEA BREAM, Sparus auratus

J. Cardoso¹, E. de Vet², G. Elgar² & D.M. Power¹

¹ Centre of Marine Sciences, Universidade do Algarve,8005-139 Faro, Portugal ² MRC-RFCCR, CB10 1SB, Cambridge, UK.

ABSTRACT. Duplicate PACAP receptors have been isolated from the marine teleost sea bream (Sparus auratus) and their ligand binding characteristics determined. The receptor genes namely SbPK713 and SbPP1C were isolated by screening sea bream kidney and pituitary cDNA libraries. The sea bream receptors isolated share 77% amino acid sequence identity and sequence comparison with similar receptors from other vertebrates and phylogenetic analysis reveal they are duplicate forms of the mammalian PACAP receptors. Tissue distribution of the duplicate receptors revealed they have an overlapping distribution. In addition, a splice variant of the receptor SbPK713 (SbPK713hop1) was also identified and its expression was found to be restricted to the gut, kidney, gonads and skin. Functional analysis of the duplicated sea bream receptors was carried out by transfecting COS7 and HEK mammalian cells lines with constructs of the receptors in pcDNA3. The results obtained support the hypothesis that a second round of gene/genome duplication occured in teleosts. Moreover, the duplicate genes are both functional and have a similar activation profile with the peptides PACAP27, PACAP36, VIP and secretin.

INTRODUCTION

The VIP and PACAP receptors are members of family 2 GPCRs, and in common with all other GPCRs are characterised by the presence of seven highly conserved transmembrane domains which anchor the receptor to the cell membrane (1). In human three members have been identified namely, PAC1, VPAC1 and VPAC2, which have similar affinities for the peptides VIP and PACAP with the exception of PAC1 which has highest affinity for PACAP. It is thought that during metazoan evolution these receptor genes arose from a common ancestral gene as a consequence of gene or genome duplication. Recently duplicated members of the VIP and PAC family have been described in the genome of the teleost Takifugu rubripes (2). Sequence comparison coupled to phylogenetic analysis revealed that the teleost receptor genes are duplicated genes of the mammalian orthologue receptor genes, and suggests that their existence is a result of specific gene duplication. The capacity of teleost genomes to accommodate extra genes when compared with other vertebrates is well documented and an extra gene or genome duplication is generally accepted to have occurred within this lineage (2). However why fish have duplicate genes compared with other vertebrates is a very debatable subject. In general, gene duplication events have been assumed to be the cause of organism complexity and the origin of gene family members during metazoan evolution (3). Three different theories have been proposed to explain the persistence of duplicated genes in vertebrate genomes. It is proposed they may i) become a pseudogene (non-functional gene), ii) acquire a completely new function or iii) share the function of the ancestral gene (4) The present study intends to contribute to the ongoing discussion about the function of duplicate genes in vertebrates by studying the evolution and function of duplicated PAC receptor genes in the sea bream (Sparus aurata).

MATERIAL AND METHODS

Sea bream library screening

Sea bream cDNA libraries were screened using a homologous PCR probe generated by RT-PCR. Two clones PP1C and PK713 with sequence similarity to the vertebrates VIP and PACAP receptors were isolated from sea bream pituitary and kidney libraries respectively.

Tissue distribution

PCR with receptor specific primers was carried out using cDNA prepared from sea bream brain, pituitary, intestine, kidney, muscle and skin. PCR reactions were carried out with an initial denaturing step of 95°C for 2 minutes, cycled 35 times according to the programme (95°C for 1 minute, 62°C for 1 minute, 72°C for 1 minute) and with a final extension of 72°C for 10 minutes.

Mammalian expression analysis

The isolated sea bream receptors were cloned into a modified pcDNA3 expression vector. This expression vector contains an artificial signal peptide sequence (CD33) and a T7 tag protein in its multiple cloning site. COS7 and Hek mammalian cell lines were transfected with the recombinant vector construct (pcDNA3+sbPAC1) using the Effecten transfection kit (Qiagen). The success of the transfection was assessed by western blot and immunofluorescence assays using anti-T7 antisera.

Ligand-Binding assav

After transfection cell were grown for 2 days before being washed and incubated in triplicate for 30 minutes with decreasing concentrations (10⁻⁶ to 10⁻¹¹) of human VIP, PACAP27, PACAP38 and secretin (Sigma-Aldrich). After incubation, cells were ressuspended in PBS/EDTA buffer and were immediately frozen at -80°C until analysis of cAMP content using a radioimmunoassay (RIA) (Amersham Biosciencies). The amount of cAMP produced by the cells was measured using a scintillation counter and data was analysed using GraphPad software. The potency profiles of each peptides was carried out be using a nonlinear regression (curve fit) approach according to a sigmoid dose-response curve and data was normalized in order to compare the receptor potency curves for each of the different peptide analysed.

RESULTS

Two receptor genes with sequence similarity to vertebrate VIP and PACAP receptors have been isolated in sea bream pituitary and kidney libraries. The sea bream receptor genes sbK713 and sbPP1C were named respectively, sbPAC1A and sbPAC1B based upon their similarity with the homologue genes previously identified in Takifugu. Expression studies of duplicate sea bream receptor genes revealed that they have an overlapping tissue distribution except in the liver where only sbPAC1B is expressed (Table 1). Transfection studies of mammalian COS7 and HEK cell lines using the recombinant pcDNA3 vector revealed that the receptors are expressed on the cell membrane (data not shown). Both sea bream receptor genes are functional and on ligand binding the cAMP intracellular signalling pathway was stimulated. The peptides used to activate sbPAC1A and sbPAC2 had a similar action and potency on both receptors; PACAP38=PACAP27>VIP>>>Secretin. Interestingly secretin failed to produce a significant response with either receptor.

Table 1. Tissue distribution of the duplicate sbPAC1 receptor genes in sea bream tissues from Pituitary (Pit), Brain (Bra), Gills (Gil), Kidney (Kid), Gut, Gonads (Gon), Heart (Hea), Muscle (Mus), Skin (Ski) and Liver (Liv). (*) indicates expression of a PAC1AHop isoform containing extra 28 aa residues between TM5 and TM6. (+) denotes the relative level of expression observed for each receptor gene. EF1-α gene was used as internal control.

	Pit	Bra	Gil	Kid	Gut	Gon	Hea	Mus	Ski	Liv	
sbPAC1A	+	+	+	++ *	++ *	++ *	+	+	++ *		_
sbPAC1B	+	++	+	+	+	+	+	++	+	+	

DISCUSSION

Duplicated PAC receptor genes have been isolated in the sea bream. These receptor genes were shown by comparative sequence analysis to contain all the major characteristics of typical family 2 receptor genes such as the presence of seven TM domains and six conserved cystein residues in the N-terminal protein domain. Functional analysis using transfected mammalian COS7 cells revealed that the duplicate receptors are heavily glycosylated and have similar activation profiles with a range of ligands. Secretin failed to significantly increase cAMP production with both teleost receptors. The results suggest the duplicate PAC1 receptors in sea bream evolved recently and still share the function of the ancestral gene.

Acknowledgments

This work was financed by a CCMAR pluriannual grant. Joao Cardoso is in receipt of a Fundação para a Ciência e Tecnologia fellowship (POCTI/SFRH/BDP/14449/03).

REFERENCES

- Bockaert, J, Claeysen, S, Becamel, C, Pinloche, S Dumuis, A 2002 G protein-coupled receptors: dominant players in cell-cell communication. Int Rev Cytol 212: 63-132
- Cardoso JC, Power DM, Elgar G, Clark MS, 2004 Duplicated receptors for VIP and PACAP (VPAC1R and PAC1R) in a teleost fish, *Fugu rubripes*. J Mol Endocrinol 33:411-428
- 3. Ohno, S 1970 Evolution by gene duplication. Springer-Verlag, Heidelberg
- 4. Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan, YL Postlethwait, J 1999 Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. Genetics 151: 1531-45

REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA SENSIBILIDAD DE LOS TEJIDOS A LA MELATONINA EN EL ANURO *Rana perezi*. LOCALIZACIÓN DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA

E. Isorna^{1,2}, A.I. Guijarro¹, N. De Pedro¹, M.A. López-Patiño¹, M.J. Delgado¹, J. Falcón², A.L. Alonso-Gómez¹

RESUMEN. La melatonina (MEL, 5-metoxi N-acetiltriptamina) se considera un mensajero capaz de codificar la información ambiental facilitando la adaptación de numerosas funciones cíclicas diarias y estacionales a los cambios ambientales. En este estudio hemos investigado la localización y regulación de los receptores de MEL en el anuro Rana perezi. Los estudios autorradiográficos apoyan la hipótesis de que en el sistema nervioso central de anfibios la MEL tiene un papel relevante en la percepción e integración de la información visual, así como en la regulación neuroendocrina. La clonación de un fragmento del receptor MT1 y su localización en diversos tejidos sugieren que en la rana algunas de las acciones de la MEL se ejercen a nivel periférico. Además, mostramos que el receptor de MEL es una estructura capaz de ser regulada por el fotoperiodo y la temperatura, siendo por tanto un elemento activo del sistema que transduce la información ambiental en una señal hormonal. Al igual que ocurre para la síntesis de MEL, en la rana, la temperatura es un factor ambiental crucial regulador de la interacción de la MEL con su receptor así como de la transducción de la señal hormonal.

INTRODUCCIÓN

La MEL se sintetiza en la retina de los anfibios con una marcada ritmicidad diaria y estacional, donde además de desempeñar funciones intraoculares es liberada a la circulación (1). Si bien se cree que la mayoría de las funciones de la MEL se realizan en tejidos del sistema nervioso central (ojos y encéfalo), donde se ha descrito la presencia de receptores de MEL en *Rana perezi* (2), las áreas diana concretas de la hormona no se conocen. Por ello hemos realizado estudios de autorradiografía en el encéfalo de esta especie. Además, para identificar qué subtipo o subtipos de receptores de MEL se expresaban en la rana, hemos clonado un fragmento de un receptor semejante a MT1 y estudiado su expresión por RT-PCR en diversos tejidos centrales y periféricos, ya que algunos trabajos apuntan a la existencia de funciones de la MEL mediadas directamente por tejidos periféricos.

Al igual que en otros poiquilotermos, en *R. perezi* la escotofase regula la duración del pico nocturno de MEL, mientras que la temperatura regula la amplitud del mismo (1,3). Sin embargo, se ignora si los tejidos diana para la MEL pueden, mediante cambios de sensibilidad, contribuir a un ajuste fino de la respuesta del organismo a la señal de la hormona. Por ello, utilizando ensayos de radioligando sobre membranas aisladas, nos propusimos averiguar el posible efecto que tiene la exposición de los animales a diferentes condiciones de iluminación y temperatura sobre los receptores centrales de MEL en *R. perezi*. Por otro lado, investigamos cómo puede afectar la temperatura de un modo directo a la transmisión de la señal melatoninérgica,

¹ Dpto. Fisiología (Fisiología Animal II). Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid. España. ²Laboratoire Aragó. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI)-CNRS. Banyuls sur Mer. France.

estudiando el efecto de este factor ambiental sobre la interacción de la MEL con su receptor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos utilizado ejemplares adultos de Rana perezi procedentes de Orense (España), mantenidos en fotoperiodo 12L:12D y 22°C de temperatura, durante al menos 2 semanas. Las autorradiografías se realizaron siguiendo el protocolo previamente descrito para mamíferos (4). La preparación de las membranas y los ensayos de radioligando se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Isorna et al. (2). La clonación del receptor de MEL se realizó utilizando oligonucleótidos degenerados para los dominios conservados en otras especies de vertebrados "CHSLPYD" y "CWAPLN". El producto obtenido por PCR se clonó en el vector PGEM-T Easy (Promega) siguiendo el protocolo del proveedor y se transformaron bacterias por electroporación. Secuenciado el fragmento, e identificado como un receptor de tipo MT1, se diseñaron oligonucleótidos específicos para los estudios de Retrotrascripción Inversa-PCR (RT-PCR) en los distintos tejidos estudiados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Autoradiografías para sitios de unión a MEL en el encéfalo de Rana perezi. El análisis autorradiográfico revela una amplia distribución de los sitios de unión a MEL en el encéfalo de Rana perezi, con una localización tanto en somas como en fibras nerviosas (Fig. 1). Se han identificado más de 30 áreas con receptores de MEL, apoyando una posible función neuromoduladora de la MEL en muchas y diversas áreas del encéfalo. No obstante, las mayores densidades encontradas en áreas visuales relacionadas con la percepción e integración de la información visual (techo óptico, tracto óptico, núcleos interpeduncular y oculomotor), así como en el hipotálamo (área preóptica, área supraquiasmática, núcleos hipotalámicos), refuerzan la hipótesis del papel clave desempeñado por la MEL en la regulación de funciones visuales y como mediador neuroendocrino en poquilotermos (2).

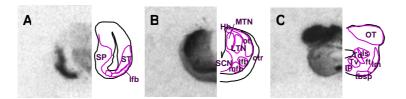


Figura 1. Autoradiografías para [125 I]Mel a tres niveles del encéfalo de R. perezi. Secciones transversales (20 μ m): A, Telencéfalo, B, Diencéfalo, C: Mesencéfalo posterior. A la izquierda se presenta el autorradiograma y a la derecha un esquema con las estructuras identificadas. ftg, fascículo del tegmento; Hb, núcleo habenular; Ip, núcleo interpeduncular; Is, núcleo del itsmo; Ifb, cerebro anterolateral; Im, lemnisco; LTN, núcleos talámicos laterales; mfb, cerebro anteromedial; MTN, núcleos talámicos mediales; OT, techo óptico, otr, tracto óptico; SCN, núcleo supraquiasmático; SP, Septum; ST, Estriado; tbsp, tracto tectobulboespinal; Td, núcleos dorsales del tegmento; Tv, núcleos ventrales del tegmento.

2. Clonación de un receptor de tipo MT1 a partir del techo óptico de R. perezi y localización de su expresión por RT-PCR en diversos tejidos. Hemos clonado una secuencia parcial (378 pb) de un receptor semejante al MT1 a partir del techo óptico de rana. La localización de este fragmento utilizando

oligonucleótidos específicos en el telencéfalo y el techo óptico, corrobora los resultados obtenidos en las autorradiografías y refuerza dichas funciones propuestas para la hormona. Sin embargo la ausencia en el diencéfalo sugiere que otros subtipos de receptores pueden estar coexpresándose en el encéfalo de esta especie, como ocurre en otros vertebrados. Además, los resultados sugieren que en *Rana perezi* algunas de las acciones de la MEL se ejercen a nivel periférico, ya que nuestro estudio demuestra, por primera vez en los anfibios, la expresión de MT1 en intestino, hígado y músculo. Si bien no descartamos la presencia de receptores de MEL en otros tejidos periféricos como gónadas, riñón, corazón o bazo, donde la expresión es probablemente muy baja, así como la existencia de distintos subtipos de receptores.

3. Influencia del fotoperiodo sobre los receptores de MEL. En el encéfalo y la retina de R. perezi, los sitios de unión a MEL presentan un ritmo diario inverso al de la hormona, con la acrofase durante el día, sugiriendo la existencia de un ritmo en la sensibilidad al indol (5). Tras exponer a los animales durante 7 días a luz continua u oscuridad continua, los sitios de unión a MEL no difieren en los tejidos encefálicos entre ambos grupos, lo que sugiere que los ritmos diarios de receptores no estarían determinados por la luz en el techo óptico, el telencéfalo y el diencéfalo, pudiendo tener por tanto un carácter endógeno o ser dependientes de los niveles de MEL. En la retina, por el contrario, la iluminación continua aumenta la capacidad del tejido para unir MEL respecto a la oscuridad continua. Sin embargo, la propia hormona in vitro no desensibiliza sus receptores tras 7 horas de tratamiento, por lo que sugerimos que los ritmos diarios observados en la retina están regulados directamente por el ciclo diario luz:oscuridad (5).

4. Modulación de la interacción receptor-ligando por la temperatura del ensayo. Ensayos realizados con membranas aisladas de la retina de R. perezi muestran que existe una compensación térmica de la constante de disociación (Kd) y la unión máxima (Bmáx) (Fig 2A). Sin embargo, las tasas de asociación y disociación del ligando a su receptor aumentan exponencialmente con la temperatura. Además, el grado de activación de proteínas G tras la unión de la MEL a su receptor, medido como la concentración del análogo no hidrolizable del GTP ($GTP\gamma S$) necesaria para inhibir la unión del ligando, también disminuye a baja temperatura (Fig 2B).

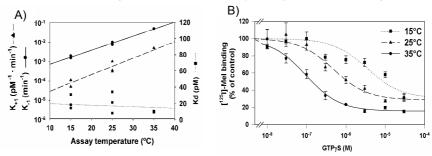


Figura 2. Efecto de la temperatura del ensayo sobre la unión del ligando a su receptor y la activación de las proteínas G asociadas. A) Modificaciones de las tasas de asociación (K_{+1}) y disociación (K_{-1}) , y constante de disociación (K_{d}) . B). Cambios en la inhibición de la unión por GTP γ S.

Por tanto, el hecho de que tanto las tasas de asociación y disociación del ligando, como que la activación de las proteínas G acopladas a los receptores, se reduzcan muy notablemente a temperatura baja, confirma el papel clave

que eierce este factor ambiental en el control de las funciones estacionales de la MEL en poiguilotermos. Ni la temperatura de aclimatación de los animales (30 días a 5 ó 22 °C) ni la estación del año (invierno y verano) afectan a la capacidad de los tejidos encefálicos y la retina para unir MEL, ni a las características cinéticas de la unión receptor-ligando (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la temperatura del ensayo y de la temperatura de aclimatación sobre los parámetros cinéticos de la unión (K+1, K-1) y la afinidad (Kd) del receptor de MEL en la retina de Rana perezi.

	Temperatura del ensayo						
	15	°C	25°C				
T ^a de aclimatación	22°C	5°C	22°C	5°C			
K ₊₁ (pM ⁻¹ ·min ⁻¹) x10 ⁻³	$0,11 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,04$			
K ₋₁ (min ⁻¹) x10 ⁻³	$2,06 \pm 0,17$	$1,64 \pm 0,21$	$10,49 \pm 0,76$	$7,72 \pm 1,10$			
K _d cinética	18,78	1,84	34,42	21,57			

Por tanto, proponemos que durante el invierno las funciones de la MEL pueden verse afectadas por un bloqueo de la interacción con su receptor o con la activación de los segundos mensajeros, ya que el enlentecimiento de la cinética así como la menor activación de las proteínas G asociadas al receptor, podrían bloquear la transducción de la señal diaria de MEL (6).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MCYT (proyecto BFI2001-1368), y por una beca predoctoral del MECD a E. Isorna. Los autores agradecen la ayuda de la Dra. M. Masson-Pévet en la realización de las autorradiografías.

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Delgado MJ, Vivien-Roels B 1989 Effect of environmental temperature and photoperiod on the melatonin levels in the pineal, lateral eye and plasma of the frog, Rana perezi: importance of ocular melatonin. Gen Comp Endocrinol 75:46-53.
- 2. Isorna E, Guijarro A, Delgado MJ, Alonso-Bedate M, Alonso-Gómez AL 2004 Characterization of melatonin binding sites in the brain and retina of the frog Rana perezi. Gen Comp Endocrinol 135:259-267.
- 3. Delgado MJ, Alonso-Gómez AL, Gancedo B, De Pedro N, Valenciano Al, Alonso-Bedate M 1993 Serotonin N-acetyltransferase and melatonin levels in the frog retina are not correlated during the seasonal cycle. Gen Comp Endocrinol 92:143-150.
- 4. Masson-Pévet M, George D, Kalsbeek A, Saboureau M, Lakhdar-Ghazal N, Pévet P 1994 An attempt to correlate brain areas containing melatoninbinding sites with rhythmic functions: a study in five hibernator species. Cell Tissue Res 278:97-106.
- 5. Isorna E, Delgado MJ, Guijarro AI, López-Patiño MA, Alonso-Bedate M, Alonso-Gómez AL 2004 2-[125]-Melatonin binding sites in the central nervous system and neural retina of the frog Rana perezi: regulation by light and temperature. Gen Comp Endocrinol 139:95-102.
- 6. Isorna E, Guijarro AI, López-Patiño MA, Delgado MJ, Alonso-Bedate M, Alonso-Gómez AL 2005 Effects of temperature on 2-[125]-iodomelatonin binding to melatonin receptors in the neural retina of the frog Rana perezi. J Pineal Res 38:176-181.

GONADOTROPHIN-RELEASING-HORMONE MODULATES THE SECRETION OF MELATONIN IN SEA BASS,

Dicentrarchus labrax

A. Servili¹, J.F. López-Olmeda², P. Herrera¹, F.J. Sánchez-Vázquez², J.A. Muñoz-Cueto¹

¹Department of Biology.Faculty of Marine and Environmental Sciences. University of Cádiz. Campus Rio San Pedro. E-11510 Puerto Real, Spain ²Department of Physiology. Faculty of Biology. University of Murcia. Spain.

ABSTRACT. In this study, we analyzed the neural connections of the pineal organ and investigated the possible relationship between pineal organ and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurons in a teleost, the European sea bass. Several brain areas, such as the dorsal synencephalon, exhibit bidirectional connection with the pineal organ. In this region we observed pinealopetal cells corresponding to chicken GnRH-II-immunoreactive neurons. Furthermore, we have tested the *in vitro* and *in vivo* effects of cGnRH-II on the secretion of melatonin, showing a stimulatory effect of cGnRH-II on nocturnal melatonin secretion. Taken together, these results suggest an important role of cGnRH-II neurons in the integration of photoperiodic information and in the mediation of photoperiod effects on reproductive events.

INTRODUCTION

The photoperiod represents the main factor entraining animal reproductive and feeding rhythms. In fish, the pineal organ is a direct photosensory and endocrine structure that receives photoperiodic information (like the retina) and conveys it to the brain via neural pathways and by a rhythmic release of melatonin into the bloodstream (Ekström and Meilss, 1997). In the European sea bass, as in other teleosts, the pineal organ is a midline structure placed in the epithalamic region, between the telencephalic hemispheres and the optic tectum of the mesencephalon. The pineal organ is the source of pinealofugal projections coursing through the pineal stalk and reaching several forebrain and midbrain areas. In addition, the presence of central neurons projecting to the pineal organ has also been referred in fish (Ekström and Meilss, 1997). Several studies indicate that melatonin may modulate the reproductive process by affecting the hypothalamo-hypophysial axis and GnRH and LH content in the pituitary, although both stimulatory and inhibitory effects of melatonin on reproduction have been suggested (Khan and Thomas, 1996; Amano et al., 2004). However, there is not information concerning a putative role of GnRH in the modulation of pineal melatonin release.

The aim of this study was to determine the neural connections of the pineal organ in the European sea bass and investigate the possible relationship between pineal projections and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurons in this species using a combination of carbocyanine (Dil) tracing methods and immunohistochemical techniques. Furthermore, we have analyzed the *in vitro* and *in vivo* effects of GnRH in the control of pineal melatonin secretion in this species.

MATERIAL AND METHODS

To reveal efferent and afferent projections of the pineal organ we used a carbocyanine fluorescent dye: 1,1'-didodecil-3,3,3',3'-tetrametyl

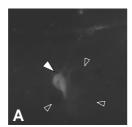
indocarbocyanine perclorate (Dil). Small crystals of Dil were applied in the pineal stalk or vesicle of fifteen sea bass (Dicentrarchus labrax) specimens. We have used immunofluorescence methods to elucidate the chemical nature of central cells projecting to the pineal gland. We processed the brain sections containing retrogradely-labeled cells projecting to the pineal organ with an antibody against chicken GnRH-II and subsequently with a secondary antibody marked with FITC.

To investigate the putative GnRH actions in the pineal organ of sea bass we have tested the effects of GnRH on the in vitro release of melatonin. The pineal organs were maintained under stable light-dark conditions (12:12) and temperature (20-24°C) in Dulbecco's modified Eagle Medium culture. The longitudinal profile of in vitro melatonin secretion was analyzed during two consecutive nights from pineal organs exposed to chicken GnRH-II (10⁻⁸M) during the first or the second night of culture.

Finally, we have analyzed the *in vivo* effects of chicken GnRH-II intraperitoneal injection on plasma melatonin levels in sea bass specimens maintained at the same conditions of photoperiod and temperature used in the in vitro study. The individual night plasma melatonin levels were determined in sea bass specimens before (MD) and after (MD GnRH) GnRH treatment. A week later, the same animals were injected with saline solution and nocturnal melatonin concentration (MD vehicle) was measured. Finally, mid-light melatonin levels were also determined (ML). Concentration of melatonin in both the in vitro and in vivo studies was determined by RIA.

RESULTS

Pinealofugal fibers exited through the pineal stalk, reached the habenula and coursed ventrocaudally innervating the ventral and dorsal thalamus, posterior commissure, periventricular pretectum, pretectal area, posterior tuberculum, paraventricular organ, posterior tuberal nucleus and dorsal synencephalon. In turn, Dil application in the pineal organ labeled retrogradely some cells in the thalamic eminentia, habenula, dorsal thalamus, ventromedial thalamus, periventricular pretectum, posterior commissure, posterior tuberculum and dorsal synencephalon. The combination of Dil-tracing methods and immunohistochemistry revealed that retrogradely labeled cells in the dorsal synencephalon (Fig. 1A) corresponded to chicken GnRH-II immunoreactive neurons (Fig. 1B). Some cGnRH-II-immunoreactive cells appear unlabeled with Dil (black arrowheads), suggesting that not all cGnRH-II cells innervate the pineal organ of the sea bass.



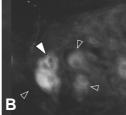


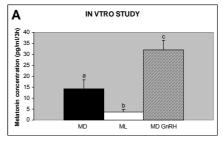
Figure 1. A: Pinealopetal cell revealed with Dil in the dorsal synencephalon. B: The Dillabelled cell was immunostained using antibody against GnRH-II (white arrowhead)

The results obtained in the in vitro experiment show an stimulatory effect of chicken GnRH-II on night melatonin secretion when compared to night melatonin levels in the absence of GnRH (Fig. 2A). The concentration of

melatonin obtained in mid of the light period was significantly lower from those obtained during the nights, reflecting that pineal organs maintain their rhythmic activity under culture conditions. Results of the *in vivo* experiment also show an increase of nocturnal plasma melatonin levels after chicken GnRH-II injection of animals in comparison to intact or vehicle-injected fish (Fig. 2A).

DISCUSSION

In this study we have revealed the afferent and efferent projections of the pineal organ in the sea bass. This analysis has permitted us to elucidate the existence of bidirectional connections between the pineal organ and the dorsal synencephalon of sea bass, a brain region that is known for the existence of chicken GnRH-II cells (González-Martinez et al., 2002). In fact, in the present study, we have demonstrated that synencephalic pinealopetal cells were chicken GnRH-II-immunoreactive neurons. This result is consistent with the presence of chicken GnRH-II fibers reaching the pineal organ of the sea bass and the expression of GnRH receptors in the pineal organ of this species (González-Martínez et al., 2004).



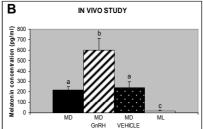


Figure 2. A: Mean values ± standard error of melatonin released in pineal cultures during the night in the absence (MD) or presence of GnRH (MD GnRH) and in the mid of the light period (ML). n=13. B: Mean values ± standard error of plasma melatonin levels obtained in sea bass specimens before (MD) and after GnRH (MD GnRH) or vehicle (MD vehicle) injection. Mid-light melatonin levels were also determined (ML). n = 7. Different letters indicate significant differences between mean values according to the Newman-Keuls multiple comparison test (p<0.05).

The bidirectional connections between the pineal organ and synencephalic chicken GnRH-II cells, together with the presence GnRH receptors in the pineal gland of the European sea bass, suggest a role of chicken GnRH-II neurons in the modulation of pineal activity. In this sense, both in *vitro* and *in vivo* experiments demonstrated that this GnRH isoform has stimulatory effects on pineal melatonin secretion during the dark phase in this teleost species. Although several studies have investigated the role of melatonin on reproductive events in fish (Bromage et al., 1995; Khan and Thomas, 1996), a putative role of GnRH in pineal function has never been demonstrated previously in teleosts. Therefore, this study represents the first report demonstrating that GnRH can modulate the melatonin secretion in a fish. According to our results, both LH and GnRH can stimulate the melatonin secretion in rodents (Vacas et al., 1987; Itoh et al., 2003).

Interestingly, retinal interplexiform cells receive inputs from centrifugal fibers originating from the olfactory bulb GnRH cells (Zucker and Dowling, 1987), and

GnRH seems to stimulate dopamine release from retinal interplexiform cells (Umino and Dowling, 1991). It should be noted that the pineal organ of fish, like the retina, contains photoreceptor cells and can receive photoperiodic information and convey it to the brain (Ekström and Meissl, 1997). Thus, it seems that both rostral (olfactory) and caudal (synencephalic) GnRH systems appear connected to the main fish photoreceptive structures (retina and pineal, respectively) and could be involved in the control of their functions as well as in the modulation of photoperiod effects on reproductive and other physiological events.

Acknowledgements

Supported by MCYT (AGL2001-0593-C03-02), MEC (AGL2004-07984-C02-02) and Junta de Andalucía (A34/02).

REFERENCES

- 1. Amano M, ligo M, Ikuta K, Kitamura S, Okuzawa K, Yamada H, Yamamori K. 2004. Disturbance of plasma melatonin profile by high dose melatonin administration inhibits testicular maturation of precocious male masu salmon. Zoolog Sci. 21: 79-85.
- 2. Bromage NR, Randall CF, Porter MJR, Davies B. 1995. How do photoperiod, the pineal gland, melatonin, and circannual rhythms interact to co-ordinate seasonal reproduction in salmonid fish? In: Goetz FW, Thomas P, editors. Reproductive physiology of fish. Fish Symp 95, Austin. p 164-166.
- 3. Ekström P, Meissl H. 1997. The pineal organ of teleost fishes. Rev. Fish Biol. Fisheries. 7: 199-284.
- 4. González-Martínez D, Zmora N, Mananos E, Saligaut D, Zanuy S, Zohar Y, Elizur A, Kah O, Muñoz-Cueto JA. 2002 Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs in the brain and pituitary of the European sea bass (Dicentrarchus labrax) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides. J. Comp. Neurol. 446: 95-113.
- 5. González-Martínez D, Madigou T, Mañanos E, Cerdá-Reverter JM, Zanuy Muñoz-Cueto JA. 2004. Cloning and expression of S, Kah O, gonadotrophin-releasing hormone receptor in the brain and pituitary of the European sea bass: an in situ hybridization study. Biology of Reproduction 70: 1380-1391.
- 6. Itoh MT. Hosaka T. Mimuro T. Hamada N. Ishizuka B. 2003. Gonadotropinreleasing hormone increases melatonin release in the pineal gland of the female rat in vitro. Horm. Metab. Res. 35: 153-157.
- 7. Khan IA, Thomas P. 1996. Melatonin influences gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (Micropogonias undulatus). Gen. Comp. Endocrinol. 104:231-242.
- 8. Vacas MI, Keller Sarmiento MI, Pereyra EN, Etchegoyen GS, Cardinali DP. 1987. In vitro effects of adenohypophysial hormones on rat pineal melatonin release and content. Mol. Cell. Endocrinol. 50:23-27.
- 9. Umino O, Dowling, JE. 1991. Dopamine release from interplexiform cells in the retina: Effects of GnRH, FMRFamide, bicuculline, and enkephalin on horizontal cell activity. Journal of Neuroscience, 11(10): 3034-3046.
- 10. Zucker CL, Dowling JE (1987) Centrifugal fibers synapse on dopaminergic interplexiform cells in the teleost retina. Nature 330:166-168.

EFECTO DEL 17β-ESTRADIOL SOBRE LA ESPERMATOGÉNESIS DE DORADA (Sparus aurata L.)

E. Chaves Pozo¹, V. Mulero¹, F.J. Arjona², L. Vargas-Chacoff², , A. García-Lopez³, G. Martínez-Rodríguez³, J. Meseguer¹, J.M. Mancera², A. García Ayala¹

¹Dpto. Biología Celular, Facultad de Biología. Universidad de Murcia. España. ²Dpto. Biología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. Universidad de Cádiz. España. ³Instituto de Ciencias Marinas de Andalucia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Cádiz. España.

RESUMEN. Estudios recientes han demostrado en mamíferos que el 17β-estradiol no es una hormona exclusivamente femenina, sino que también es producida por los machos interviniendo activamente en el desarrollo y funcionalidad testicular. En teleósteos son pocos los estudios realizados sobre esta hormona en machos, aunque se ha sugerido un posible papel en la proliferación de las espermatogonias y la fisiología de las células de Sertoli.

INTRODUCCIÓN

La dorada es un espárido hermafrodita protándrico que muestra una gónada formada por un ovotestículo, constituido por una porción ovárica en la zona mediodorsal, y una porción testicular en la zona lateroventral. La zona testicular desarrolla una espermatogénesis asincrónica durante los dos primeros años de vida del animal antes de iniciar el cambio de sexo. La gónada de la dorada, como en la mayoría de los espáridos protándricos, presenta una zona de ovario inmaduro, con ovocitos previtelogénicos durante la etapa de macho activo (1,2). El ciclo reproductor de los machos de dorada se divide, según el desarrollo testicular, en cuatro etapas: espermatogénesis, puesta, post-puesta y quiescencia. La etapa de post-puesta se caracteriza por una serie de cambios morfológicos muy marcados que llevan a la regeneración del tejido testicular. Así, se observan diversos procesos involutivos: i) fagocitosis de los espermatozoides por las células de Sertoli, ii) apoptosis de las espermatogonias primarias; y de proliferación i) aumento de la tasa proliferativa de las células madre de la espermatogénesis y las células de Sertoli (3). Además, se produce una infiltración masiva de granulocitos acidófilos, unas células pertenecientes al sistema inmunitario (4). Todos estos cambios morfológicos acontecen en la etapa de post-puesta, caracterizada por unos niveles de 17β-estradiol (E2) en suero mayores que los de la etapa de espermatogénesis (5). En este trabajo nos proponemos estudiar in vivo, los efectos del E2 en ejemplares adultos en las etapas finales de la espermatogénesis con el fin de determinar su posible papel en el inicio y desarrollo de la post-puesta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Los ejemplares de dorada adultos con un peso medio de 400g fueron proporcionados y mantenidos en la Planta de Cultivos Marinos (C.A.S.E.M., Universidad de Cádiz, Puerto Real, Cádiz). Los ejemplares fueron mantenidos

en agua de mar en circuito abierto y bajo condiciones naturales de fotoperiodo (diciembre 2004) y temperatura constante (18° C).

Tratamiento

Los ejemplares fueron inyectados intraperitonealmente con aceite de coco (Sigma, 5μl/g peso) o conteniendo E₂ (Sigma, 5 μg/g de peso). Los ejemplares (n=8 por grupo y tiempo) se muestrearon a 7, 13 y 18 días tras la inyección. Todos los ejemplares muestreados fueron inyectados intraperitonealmente 2 horas antes del muestreo con 5'Bromo-2'desoxiuridina (BrdU, Sigma, 50 mg/Kg peso). Los ejemplares fueron pesados y se les extrajo plasma para la determinación de esteroides en plasma, y las gónadas que fueron pesadas y procesadas para su estudio microscópico.

Microscopía

Las gónadas se fijaron en líquido de Bouin o paraformaldehído al 4% durante 16 horas y previa deshidratación se incluyeron en parafina (Paraplast Plus). Se obtuvieron secciones seriadas de 5 µm que o bien fueron teñidas con hematoxilina-eosina o se utilizaron para la localización de BrdU y granulocitos acidófilos. Para ello se utilizaron anticuerpos anti-BrdU (Caltag) y uno específico de los granulocitos acidófilos de dorada (G7, Sepulcre y col., 2002).

Determinación de los niveles hormonales en plasma

Los niveles de E2, 11-ketotestosterona (11-KT) y testosterona (T) libres en plasma fueron cuantificados mediante un inmunoensavo competitivo siguiendo el método anteriormente descrito (6) y usando como marcadores enzimáticos acetil colinesterasa conjugada con las diferentes hormonas (11-KT-AChE, T-AChE y E2-AChE, Cayman Chemical Company) y como anticuerpo específico (anti-11-KT, anti-T o anti-E₂). Los estándares y las muestras de plasma fueron analizados por duplicado. Los límites menores de detección (90% de unión, ED90) fueron 0'045 \pm 0'002 pg/pocillo para la 11-KT (n=2), 0'077 \pm 0'013 pg/pocillo para la T (n=2) y 0'058 \pm 0'004 pg/pocillo para el E_2 (n=2). Los coeficientes internos de variación de los ensayos al 50% de unión fueron 0'96% para 11-KT (n=2), 3'48% para la T (n=2) y 0,30 % para el E₂ (n=2).

RESULTADOS

Los niveles de hormonas plasmáticas fueron analizados, corroborándose que los valores de E2 aumentaban tras el implante, siendo máximos a los 7 días post-tratamiento y disminuyeron progresivamente conforme pasaba el tiempo. Además se observó a los 18 días tras el tratamiento un descenso de los niveles de andrógenos (T y 11-KT).

Los ejemplares controles se encontraban en la etapa final de espermatogénesis, caracterizada por presentar una elevada proporción de quistes de espermatocitos y espermátidas y algunos espermatozoides libres en la luz tubular, la cual es más bien estrecha.

El tratamiento con E2 provocó cambios en la estructura gonadal, observándose una eliminación drástica de los quistes de espermatogonias primarias, espermatocitos y espermátidas. Al mismo tiempo aumentaron considerablemente la densidad de espermatozoides libres en la luz tubular, la cual se ensancha considerablemente. A los 7 días del tratamiento los cambios morfológicos ya son visibles, aunque todavía se observan algunos quistes de espermátidas. Sin embargo a los 13 días tras la inyección, la estructura tubular queda reducida al intersticio con algunas células madre de las espermatogonias dispersas, mientras los túbulos se observan ensanchados y llenos de espermatozoides. A los 18 días de tratamiento, el epitelio germinal ha sido repoblado de espermatogonias madre en algunas zonas aunque los espermatozoides no fueron emitidos y aparecen rellenando los tubulos ensanchados.

El uso del BrdU muestra como las células madre de las espermatogonias, así como los quistes de espermatogonias y espermatocitos en proliferación se ven drásticamente reducidos a partír de los 13 días post-tratamiento. Por su parte, las espermatogonias primarias en proliferación se reducen a partir de los 7 días post-tratamiento. Es de destacar que a este tiempo se observa una mayor cantidad de células de Sertoli en proliferación mientras que a los 13 días se aprecia una ligera reducción de las mismas.

En los ejemplares control y en los tratados con E_2 durante 7 y 13 días los granulocitos acidófilos se observan aislados o en pequeños grupos en el intersticio testicular. Sin embargo, a los 18 días tras el tratamiento grandes grupos de granulocitos acidófilos aparecen en el intersticio testicular.

DISCUSIÓN

Las diferentes etapas del ciclo reproductor de teleósteos son reguladas. directa o indirectamente, por las hormonas sexuales, observándose una disminución importante de los niveles de 11-KT en las etapas de puesta, postpuesta y quiescencia (7). Además en la etapa de post-puesta, se produce un aumento de 2 veces en los niveles circulantes de E2 en los machos de dorada (5). Este hecho sugiere que posiblemente los procesos de involución y proliferación observados en el testículo de dorada durante la etapa de postpuesta son regulados por los altos niveles de E2 y apoya la hipótesis de que el E2 podría regular en machos la proliferación de las espermatogonias y la fisiología de las células de Sertoli (8). Nuestros datos demuestran que el E2 administrado en las etapas finales de la espermatogénesis es capaz de acelerar los procesos terminales de la misma a corto tiempo (7 días), aumentando la densidad de espermatozoides en el interior tubular, sin que existan cambios drásticos en los niveles de andrógenos. Además, produce una disminución en la proliferación de las células germinales, tal y como ocurre en la etapa de puesta (3), aunque las células de Sertoli en proliferación aumentan. Sin embargo, a tiempo más largo (18 días) el aumento de los niveles plasmáticos de E2 provoca una disminución de los niveles de andrógenos. Es importante resaltar que la 11-KT sufre una disminución mayor que la T. la cual mantiene sus niveles ligeramente superiores a los de la 11-KT. Este comportamiento coincide con lo descrito en los machos de dorada en la etapa de post-puesta (5), y sugiere que el tratamiento hormonal realizado consigue simular, al menos tras 18 días de tratamiento, los niveles hormonales de dicha etapa. Así a este tiempo las únicas células que proliferan son las células madre de las espermatogonias y las células de Sertoli, permitiendo con esto la aparición, en las zonas periféricas, de grupos de espermatogonias primarias y la recuperación del tejido germinal tal y como ocurre en la post-puesta (3). Sin embargo, la infiltración masiva de granulocitos acidófilos no es muy drástica a los 18 días del tratamiento. Este hecho podría indicar que los niveles de esteroides en plasma necesitarían de otros factores posiblemente producidos por el testículo o por los propios granulocitos previamente infiltrados. Uno de estos factores podría ser la interleuguina-1β, una citoquina proinflamatoria producida de forma constitutiva únicamente por los granulocitos acidófilos testiculares (9). Estos factores regularían parte de los procesos celulares observados durante la etapa de post-puesta en los machos de dorada.

Agradecimientos

Agradecemos a la Fundación CajaMurcia de la CARM por la beca de E. Chaves-Pozo y a la financiación proporcionada por el proyecto BFU2004-04439-C02-01 (Ministerio de Ciencia y Tecnología) a J.M. Mancera y el proyecto 00471/PI/04 (Fundación Séneca de la CARM) a A. García Ayala.

- 1. Besseau L v Faliex E 1994 Resorption of unemitted gametes in Lithognathus mormyrus (Sparidae, Teleostei): a possible synergic action of somatic and immune cells. Cell Tissue Res 276: 123-132
- 2. Bruslé-Sicard S v Fourcault B 1997 Recognition of sex-inverting protandric Sparus aurata: ultrastructural aspects. J Fish Biol 50: 1094-1103.
- 3. Chaves Pozo E, Mulero V, Meseguer J, García-Ayala A 2005 An overall view of of cell renewal in the testis throughout the reproductive cycle of a seasonal breeding teleost, the gilthead seabream (Sparus aurata L.). Biol Reprod 72: 593-601
- 4. Chaves-Pozo E, Muero V, Meseguer J, García-Ayala A 2005 Professional phagocytic granulocytes of the bony fish gilthead seabream display functional adaptation to testicular microenvironment. J Leuk Biol 78: 345-
- 5. Chaves Pozo E, Arjona FJ, García-López A, Schulz RW, Mulero V, Meseguer J, García-Ayala A 2005 Seaonal profile of sex-steroid hormones, estradiol receptors and cytochrome P450 aromatase throughout the reproductive cycle of the male gilthead seabream (Sparus aurata L.). Gen Comp Endocrinol (enviado)
- 6. Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S y Carrillo M 2000 Development and validation of an enzyme inmunoassay for testosterone: Effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (Dicentrarchus labrax, L.) at puberty. Fish Physiol Biochem 23: 141-150
- 7. Borg B 1994 Androgens in teleost fishes. Comp Biochem Physiol C 109: 219-245
- 8. Miura T y Miura C 2001 Japanese eel: A model for analysis of spermatogenesis. Zool Scien 18: 1055-1063
- 9. Chaves Pozo E, Pelegrín P, Mulero V, Meseguer J, García Ayala A. 2003 A role for acidophilic granulocytes in the testis of the gilthead seabream (Sparus aurata L., Teleostei). J Endo 179: 165-174.

CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS ISOFORMAS TRUNCADAS DE RECEPTORES DE SOMATOSTATINA

M. Durán-Prado¹, R. Vázquez-Martínez¹, B.J. González², C. Bucharles², H. Vaudry², S.J. Rhodes³, S. García-Navarro¹, M.M. Malagón¹, J.P. Castaño¹

¹Dpto. Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba. España. ²Lab Cellular and Molecular Neuroendocrinology, INSERM U413, Univ. of Rouen, France. ³Department of Cellular and Integrative Physiology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana, USA.

RESUMEN. La somatostatina o SRIF actúa a través de receptores del tipo de siete dominios transmembrana llamados ssts. Hasta el momento, se han descrito cinco subtipos de ssts, sst1-sst5 y además una isoforma del sst2 originada por procesamiento alternativo del ARNm, denominada sst2b. Durante la clonación de los ssts porcinos, además de obtener los ssts homólogos a los ya caracterizados en otras especies, identificamos dos nuevas isoformas truncadas del sst5, que codifican proteínas de 6 y 3 dominios transmembrana. Ambas isoformas, contrariamente a lo que cabría esperar, son funcionales, se activan de forma diferencial por péptidos de la familia de la somatostatina y además parecen interaccionar físicamente con isoformas no truncadas de ssts alterando su distribución preferencial en membrana plasmática.

INTRODUCCIÓN

Hace ya mas de una década desde que Yamada *et al.* (1) caracterizara por vez primera la secuencia y estructura topológica de los receptores de somatostatina. La unión de la somatostatina (SRIF) a cada uno de sus receptores origina la modulación selectiva de rutas de transducción de señales, produciendo generalmente un efecto inhibitorio (2).

En nuestro grupo de investigación, estudios previos sobre la secreción de GH en la somatotropas porcinas reveló que la somatostatina no solo juega un papel inhibidor, sino que además es capaz de estimular la secreción basal de GH cuando se emplea a dosis bajas en el rango de pM (3, 4). Este efecto tan atípico es mediado por mecanismos que implican tanto la estimulación de la adenilato ciclasa (AC) como la ruta óxido nítrico sintasa (NOS) óxido nítrico (NO). Diversos estudios llevados a cabo empleando agonistas específicos para cada subtipo de sst revelaron que ambos sst1 y sst2 parecen ser los responsables de mediar la acción inhibidora de la somatostatina, mientras que el sst5 sería el principal mediador de su acción estimuladora. Este peculiar efecto nos condujo a la clonación de los sst porcinos para su posterior caracterización utilizando modelos celulares heterólogos.

Durante este proceso de clonación, aislamos dos cDNAs correspondientes a dos isoformas truncadas del sst5 llamadas psst5b y psst5c respectivamente, ambas con un bajo nivel de expresión en hipófisis pero con un patrón de expresión tisular muy restringido y elevado en algunos tejidos. Estudios de cinética de calcio intracelular indican que ambos receptores son funcionales y responden de forma diferencial a péptidos tan similares como la somatostatina y la cortistatina. Es mas, ensayos combinados de colocalización y FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) revelan que al menos una de estas isoformas, el sst5c, es capaz de interaccionar de forma selectiva con otros ssts porcinos formando complejos heterodiméricos, cambiando la

distribución original en membrana plasmática de los receptores no truncados con los que interaccionan.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clonación de los ssts porcinos. El sst2 porcino fue clonado mediante PCR como se describe en Durán-Prado et al. 2005 (5). Para el resto de ssts se utilizó una estrategia mixta de PCR para amplificar fragmentos de cDNA muy conservados en todas las especies que se utilizaron para escrutar una librería de expresión de hipófisis porcina (6). Con esta estrategia se consiguieron fragmentos parciales de los sst1, 3, 4 y 5. A partir de esas secuencias se diseñaron oligonucleótidos específicos que permitieron obtener mediante RACE PCR sobre cDNA de hipófisis, tanto las secuencias codificantes como los extremos UTR de cada receptor (excepto sst4). Mediante esta técnica se obtuvieron además dos cDNAs que codifican las isoformas truncadas del sst5. Inserción de los sst porcinos en vectores de expresión eucariota. Todos los sst clonados se introdujeron en el vector de expresión pCDNA3, al igual que se hizo previamente para el sst2 para su expresión en líneas tumorales. Además mediante PCR utilizando una polimerasa de alta fidelidad se introdujo cada uno de los receptores porcinos en los vectores E-YFPN1 y E-CFPN1 (Clontech) utilizando oligonucleótidos cebadores en los que se incluyeron los sitios diana para las enzimas de restricción adecuadas.

Transfección. Para obtener líneas transfectadas estables de cada uno de los receptores recombinantes se utilizó la línea celular tumoral CHO-K1, tal y como se describió previamente (5). Estas líneas celulares se utilizaron para la medida de segundos mensajeros; se estudió fundamentalmente la producción de AMPc y la cinética del ${\rm Ca}^{2^+}$ intracelular. Para ensayos de localización celular, colocalización, así como de interacción entre ssts mediante la técnica de FRET, se realizaron transfecciones transitorias en la línea celular HEK 293 AD, así como cotransfecciones con los ssts insertos en la pareja de vectores E-YFPN1 y E-CFPN1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como modelo para la caracterización del resto de ssts, comenzamos estudiando el receptor inhibidor sst2. Para ello, lo clonamos y transfectamos de forma estable en la línea celular CHO-K1. Estudios de saturación empleando un análogo radiactivo de SRIF, indican que se trata de un receptor de alta afinidad por SRIF 14 y además, en ensayos de competición, tanto compuestos peptídicos como el agonista no peptídico específico del receptor sst2 presentan una elevada capacidad de desplazamiento de somatostatina marcada. Sin embargo, se observa un coeficiente de Hill menor de -1 para SRIF 14 y CST 17 que es especialmente llamativo, indicando mas de un tipo de sitios de unión diferentes, lo cual sugirió la posible naturaleza homodimérica constitutiva del sst2 transfectado.

Mediante la técnica de FRET, empleando dos construcciones de p-sst2 acopladas a CFP e YFP respectivamente, pudimos comprobar que efectivamente el sst2 porcino forma homodímeros de modo constitutivo y que este estado dimérico no parecía afectarse por un tratamiento prolongado de 30 minutos con SRIF-14 10⁻⁷ M. Sin embargo, la monitorización de la señal de FRET en tiempo real, permitió comprobar que los homodímeros se disocian rápidamente en tan solo 11 segundos, hecho que parece ser esencial para el comienzo del proceso de internalización del receptor. Una vez completamente internalizado en tan solo unos minutos, la señal de FRET vuelve a restablecerse. lo que indica que los monómeros vuelven a reasociarse de nuevo en el interior celular.

Como era de esperar, el sst2 transfectado inhibió el AMPc estimulado por forscolina en respuesta a somatostatina. De hecho, mediante la misma aproximación el sst1 también inhibió el AMPc estimulado, al igual que lo hizo, aunque inesperadamente, el sst5. Además, contrariamente a lo esperado, la somatostatina no estimuló el AMPc basal a través del sst5.

Sin embargo, durante la clonación del sst5, identificamos mediante RACE dos nuevas isoformas truncadas del sst5 originadas por "splicing" alternativo que denominamos sst5b y sst5c. El análisis de las secuencias predice proteínas de 6 y 3 dominios transmembrana respectivamente que carecen del motivo YANSCANP que define a familia de receptores de somatostatina de mamíferos aunque si poseen el motivo conservado DRY en una región intracelular localizada al final del tercer bucle transmembrana. Esta es la primera vez que se describe la existencia de una isoforma de sst originada por "splicing" alternativo con menos de 7 dominios transmembrana. Ambas isoformas muestran un bajo nivel de expresión en hipófisis, aunque presentan un patrón de expresión tisular diferencial. El sst5b solo parece expresarse a un nivel considerable en intestino, mientras que el sst5c presenta un patrón de distribución algo más amplio, siendo su expresión más abundante en médula ósea, músculo liso e intestino.

En ensayos funcionales, no parece que ninguna de las isoformas sst5b y sst5c modifique de forma destacable el nivel de AMPc basal o estimulado por forscolina. Sin embargo, ensayos de movilización de calcio intracelular indican que efectivamente ambos, sst5b y sst5c, son funcionales y desencadenan una potente respuesta estimuladora rápida y transitoria (tipo pico) en respuesta a agonistas sintéticos como el SOM 230 y además originan una respuesta diferencial frente a los agonistas peptídicos naturales SRIF14 y CST17. De esta forma, el sst5b responde preferentemente a somatostatina mostrando una respuesta de tipo pico con un tiempo medio de respuesta de 22 s, aunque también se detectan algunas repuestas similares a CST 17, aunque tardías, a los 81 s desde el tratamiento y en mucho menor número. Sin embargo y contrariamente al sst5b, el sst5c responde preferentemente a CST 17, también originando una respuesta de tipo pico, con un tiempo medio de respuesta de 33 segundos. Por contra el 1% de las células respondieron también a SRIF 14 aunque la magnitud de dicha respuesta fue de casi la mitad que la originada por CST 17.

Resulta además muy interesante la peculiar distribución, a nivel subcelular de estos reeptores; mientras que el sst5a se localiza preferentemente en la membrana plasmática, ambos sst5b v sst5c presentan una gran cantidad de acúmulos citoplasmáticos. Es más, en experimentos de transfección de sst5a-CFP y sst5c-YFP comprobamos cómo células cotransfectadas muestran una distribución preferentemente citoplasmática igual que en células que expresan el sst5c individualmente. Esto nos sugirió que este cambio en la distribución intracelular del sst5a mediada por el sst5c podría ser provocada por interacción física entre ambos receptores, lo cual corroboramos mediante FRET. De esta forma, mientras que el sst5a no forma homodímeros de forma constitutiva y el sst5c si que lo hace, ambos sst5a y sst5c muestran una elevada tendencia a formar heterodímeros. Es mas, resultados preliminares mostraron que además, el sst5c también interacciona físicamente con el sst1 y en menor medida con el sst3, aunque no parece heterodimerizar con el sst2. En conjunto, nuestros resultados muestran por vez primera la existencia de

nuevas isoformas de receptores de somatostatina insospechadas hasta la

fecha. con menos de siete dominios transmembrana y a pesar de ello, funcionales. La medida de AMPc en células transfectadas de forma estable con los receptores sst5a, sst5b y sst5c indicó que ninguno de ellos parece ser el responsable directo del efecto estimulador sobre la secreción de GH mediado por somatostatina en las somatotropas porcinas o al menos, ninguno de esos receptores de forma aislada. Sin embargo, los ssts porcinos interaccionan para formar complejos diméricos y posiblemente multiméricos, que pueden cambiar sus propiedades nativas tanto farmacológicas como de modulación de rutas de segundos mensajeros.

Agradecimientos

Financiación: CVI-139-Junta Andalucía; BFI 2001-2007; BFU2004-03883-MEC.

- 1. Yamada Y, Post SR, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S 1992 Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. Proc Natl Acad Sci USA 89 251-255.
- 2. Florio T, Schettini G 1996 Multiple intracellular effectors modulate physiological functions of the cloned somatostatin receptors. J Mol Endocrinol 17:89-100.
- 3. Castaño JP, Torronteras R, Ramirez JL, Gribouval A, Sanchez-Hormigo A, Ruiz-Navarro A, Gracia-Navarro F 1996 Somatostatin increases growth hormone (GH) secretion in a subpopulation of porcine somatotropes: evidence for functional and morphological heterogeneity among porcine GH-producing cells. Endocrinology 137:129-136.
- 4. Ramirez JL, Gracia-Navarro F, Garcia-Navarro S, Torronteras R, Malagon MM, Castaño JP 2002 Somatostatin stimulates GH secretion in two porcine somatotrope subpopulations through a cAMP-dependent pathway. Endocrinology 143:889-897.
- 5. Durán-Prado M, Delgado E, Molina-Sánchez M, García-Navarro S, Gracia-Navarro F, Malagón MM, Castaño JP. Cloning and expression of porcine sst2A in CHO-K1 cell line. Avances en Endocrinología Comparada. Vol. II. J.P. Castaño, M.M. Malagón, S. García Navarro (eds.) Córdoba: Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba (2005) pp 235-238.
- 6. Delgado E, Lugue RM, Durán-Prado M, Sánchez-Hormigo A, Molina M, Rodríguez-Pacheco P, Peinado JR, Cruz D, García-Navarro S, Gracia-Navarro F, Garrido JJ, Malagón MM, Castaño JP. Characterization of porcine somatostatin receptors. Avances en Endocrinología Comparada. Vol. II. J.P. Castaño, M.M. Malagón, S. García Navarro (eds.) Córdoba: Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba (2005) pp 23-29.

EFECTOS DE LA HORMONA 3, 5, 3-TRIIODO-L-TIRONINA (T₃) SOBRE PARÁMETROS OSMORREGULADORES Y METÁBOLICOS EN LA DORADA Sparus auratus

L. Vargas-Chacoff¹, R. Laiz-Carrión¹, F.J. Arjona¹, P. Klaren², G. Flik², M.P. Martín del Río¹ y J.M. Mancera¹

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, 11510 Puerto Real, Cádiz. E-mail: luis.vargas@uca.es ²Department of Animal Physiology, Faculty of Science, Radboud University Nijmegen, The Netherlands.

RESUMEN. Se analizó la influencia de la inyección de la hormona 3,5,3-triiodo-L-tironina (T_3) sobre diversos parámetros osmorreguladores y metabólicos en dorada *Sparus auratus*. Para ello se usaron 4 concentraciones diferentes de hormona (0; 2,5; 5,0 y 10,0 µg/g peso), y se muestrearon los días 0 (grupo sin inyección), 3 y 6 post-inyección. Los resultados mostraron que: a) los niveles de T_3 plasmáticos se incrementaron a lo largo del experimento, b) los parámetros osmorreguladores (osmolalidad y actividad Na^+, K^+ -ATPasica renal) disminuyeron, y c) los parámetros metabólicos plasmáticos (glucosa, lactato, triglicéridos y proteínas) aumentaron. Estos resultados sugieren que la hormona T_3 tiene un efecto tanto a nivel osmorregulador como a nivel metabólico en dorada.

INTRODUCCIÓN

Las hormonas tiroideas regulan diversos procesos fisiológicos en teleósteos, pero el papel osmorregulador no está claro (1). En salmónidos, inyecciones repetidas de T_4 incrementa la actividad Na^+, K^+ -ATPasica branquial y el número de células de cloruro en *Salmo salar* (2) y *S. gairdneri* (3), pero no en otras especies (1). Además, se ha descrito una interacción entre T_3 y hormona de crecimiento o cortisol en *S. trutta* y *Onchorynchus mykiss* aclimatados a agua de mar (4).

Sin embargo, en peces no salmónidos el papel osmorregulador de las hormonas tiroideas no está bien definido. Tratamientos con tiourea (un antagonista del sistema tiroideo) mostraron que una glándula tiroides funcional es esencial para el mantenimiento del balance osmótico y de sodio además de para la supervivencia de *Fundulus heteroclitus* en agua de mar (5). Sin embargo, tratamientos con T₃ no aumentaron la actividad Na⁺,K⁺-ATPasica branquial y la tolerancia a la salinidad en esta especie (6). Por otra parte, tratamientos con concentraciones fisiológicas de T₃ y T₄ incrementa la capacidad hipoosmorreguladora de tilapias adaptadas a agua dulce, debido a un aumento de la actividad Na⁺,K⁺-ATPasica branquial, tamaño de las células de cloruro branquial y disminución de la actividad Na⁺,K⁺-ATPasica renal.

El presente estudio tiene por objetivo analizar los efectos del tratamiento con T_3 sobre el sistema osmorregulador y metabolismo plasmático de la dorada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ejemplares inmaduros de *S. auratus* (87.84 g \pm 23.5) adaptados a agua de mar fueron inyectados intraperitonealmente (n=18 por cada grupo experimental) con diferentes dosis de T₃ (0; 2,5; 5,0 y 10,0 μ g/g peso) suspendido en aceite de coco y muestreados a los 3 y 6 días del implante. Además, un grupo control (n=9) sin inyectar fue muestreado el día 0. La

concentración plasmática de T₃, de parámetros osmorreguladores plasmáticos (osmolalidad v concentración de sodio), la actividad Na⁺,K⁺-ATPásica branquial y renal, así como de parámetros metabólicos (glucosa, lactato, proteínas y triglicéridos) se determinó utilizando técnicas descritas previamente. En todos los casos los datos se muestran como la media \pm EEM y se analizaron ANOVA seguido de un test Tukey HSD.

RESULTADOS

La concentración plasmática de T₃ aumentó de un modo directamente proporcional con las concentraciones de hormona inyectada. Sin embargo, al cabo del día 6 las concentraciones bajaron, aunque los niveles se mantuvieron por encima del grupo control.

A nivel osmorregulador el tratamiento hormonal disminuyó los valores de osmolalidad plasmática, aunque la concentración de sodio plasmático y la actividad Na⁺,K⁺-ATPasica branquial no se modificaron (valores no mostrados) respecto a los valores del grupo control. Sin embargo los animales tratados con T₃ presentaron diferentes actividades Na⁺,K⁺-ATPasica renal dependiendo de la concentración hormonal inyectada, pero siempre con valores por debajo del grupo control. Así los animales invectados con 5.0 µg-T₃/g presentaron a los 3 días de experimento los valores más bajos de actividad, en cambio a los 6 días de experimento los animales tratados con 2,5 µg-T₃/g eran los que presentaron los menores valores.

Tabla I. Parámetros osmorreguladores. Los valores son las Media + EEM de 9 animales. Letras diferentes indican diferencias significativas entre el día 0 y los días 3 y 6 a una misma concentración (P<0,05), * indica diferencias significativas entre las diferentes concentraciones a los 3 días de experimento, # indica que existe diferencia significativa entre las diferentes concentraciones a los 6 días de experimento. La osmolalidad se expresa en mOsm y la actividad Na⁺,K⁺-ATPásica renal en μmolADP/mg

Grupos	Osmolalidad	Act. Na ⁺ ,K ⁺ -ATPásica	
		renal	
Sin Inyectar día 0	375 <u>+</u> 2 a	20,28 <u>+</u> 0,56 a	
Vehículo día 3	374 <u>+</u> 3 a	20,74 <u>+</u> 0,60 a	
Vehículo día 6	368 <u>+</u> 4 a	19,13 <u>+</u> 0,75 a	
2,5 μg-T ₃ /g día 3	369 <u>+</u> 3 b	18,74 <u>+</u> 0,80 a	
2,5 μg-T ₃ /g día 6	341 <u>+</u> 3 b, #	15,93 <u>+</u> 0,56 b, #	
5,0 μg-T ₃ /g día 3	349 <u>+</u> 4 b, *	15,51 <u>+</u> 0,59 b, *	
5,0 μg-T ₃ /g día 6	367 <u>+</u> 3 a	19,66 <u>+</u> 0,65 a	
10,0 μg-T ₃ /g día 3	349 <u>+</u> 4 b, *	19,87 <u>+</u> 0,66 a	
10,0 μg-T ₃ /g día 6	353 <u>+</u> 6 b, #	19,16 <u>+</u> 0,75 a	

La glucosa plasmática incrementó sus valores de un modo tiempo- y dosisdependiente tras el tratamiento con T₃. El lactato mostró al tercer día sus mayores niveles con la concentración de 2,5 µg/g de T₃. La proteína aumentó sus valores en un corto plazo (3 días), pero al sexto día mostraron valores similares al control (valores no mostrados). Los triglicéridos, presentaron al día 3 un aumento proporcional a las concentraciones de T_3 , y disminuyeron ligeramente al cabo de los 6 días de experimento.

Tabla II. Parámetros metabólicos plasmáticos. Los valores son las Media ± EEM de 9 animales. Letras diferentes indican diferencias significativas entre el día 0 y los días 3 y 6 a una misma concentración (P<0,05). * indica diferencias significativas entre las diferentes concentraciones a los 3 días de experimento, # indica diferencias significativas entre las diferentes concentraciones a los 6 días de experimento.

Grupos	Glucosa mmol/L	Triglicéridos mmol/L	
Sin Inyectar día 0	3,39 <u>+</u> 0,08 a	1,26 <u>+</u> 0,07 a	
Vehículo día 3	3,25 <u>+</u> 0,17 a	1,35 <u>+</u> 0,02 a, *	
Vehículo día 6	3,52 <u>+</u> 0,10 a, #	1,24 <u>+</u> 0,05 a, #	
2,5 μg-T ₃ /g día 3	3,32 <u>+</u> 0,08 a	1,85 <u>+</u> 0,07 b	
2,5 μg-T ₃ /g día 6	4,32 <u>+</u> 0,20 b, #	1,56 <u>+</u> 0,05 c	
5,0 μg-T ₃ /g día 3	3,65 <u>+</u> 0,14 a	1,93 <u>+</u> 0,08 b	
5,0 μg-T ₃ /g día 6	4,93 <u>+</u> 0,17 b, #	1,65 <u>+</u> 0,07 b, #	
10,0 μg-T ₃ /g día 3	4,18 <u>+</u> 0,26 a, *	2,08 <u>+</u> 0,09 b	
10,0 μg-T ₃ /g día 6	5,88 <u>+</u> 0,29 b, #	1,96 <u>+</u> 0,11 b, #	

DISCUSIÓN

Los valores de T₃ en el plasma muestran que el método de administración de la hormona, vía intraperitoneal suspendida en aceite de coco es adecuado para incrementar de manera estable los valores de esta hormona en plasma. Los parámetros osmorreguladores mostraron una disminución en los valores de osmolalidad y la actividad Na⁺,K⁺-ATPasica renal debido al tratamiento. Sin embargo, los valores de sodio y de actividad Na⁺,K⁺-ATPasica branquial, no presentaron diferencias significativas respecto al control. Estos resultados se contraponen a los obtenidos en tilapias mantenidas en agua dulce (7) donde los valores de sodio y la actividad Na⁺,K⁺-ATPasica branquial, mostraron un incremento de sus valores al aplicar un tratamiento hormonal similar.

Los parámetros metabólicos plasmáticos mostraron un efecto por la acción hormonal. Así los valores de glucosa y de triglicéridos aumentan de un modo directamente proporcional a la concentración de hormona inyectada. Sin embargo, los valores de proteína sólo mostraron un efecto a corto plazo, ya que a los seis días de experimento estos valores se tornaron similares a los presentados por el control. Por otra parte, los valores de lactato, mostraron a corto plazo un incremento de su concentración dado por la acción hormonal a bajas concentraciones, pero al cabo de los seis días de experimento los valores aumentaron proporcionalmente a la concentración de hormona inyectada. Estos efectos concuerdan con resultados obtenidos en otras especies (8,9) y ponen de manifiesto el papel catabólico de la T₃.

Conclusiones

El método usado para la administración de T₃ resultó ser adecuado para incrementar la concentración hormonal en el plasma.

La hormona T₃ mostró un efecto a nivel osmorregulador, presentando una disminución tanto de la osmolalidad plasmática como de la actividad Na+,K+-ATPasica renal, aunque no afectó a la actividad Na⁺,K⁺-ATPasica branquial.

El tratamiento hormonal incrementó las concentraciones de metabolitos plasmáticos lo que apoya el papel catabólico de esta hormona.

Agradecimientos

Estudio financiado por el proyecto BFU2004-04439-C02-01 (Ministerio Educación y Ciencia) a J.M.M.

- 1. McCormick S 1995 Hormonal control of gill Na⁺, K⁺-ATPase and chloride ell function. Fish Physiology. (Wood, C.M. and Shuttlewoth, T.J., Eds.). Vol. 14, pp: 285-315. Academic Press, New York
- 2. Madsen S, Korsgaard B 1989 Time course of effects of repetitive oestradiol-17β and thyroxine injections on the natural spring smolting of atlantic salmon, Salmo salar L. J Fish Biol 35:119-128
- 3. Madsen S 1990 The role of cortisol and growth hormone in seawater adaptation and development of hipoosmoregulatory mechanism in sea trout parr (Salmo trutta trutta). Gen Comp Endocrinol 79:1-11
- 4. Leloup J, Lebel J 1993 Triiodothyronine is necessary for the action of growth hormone in acclimation to seawater of brown (Salmo trutta) and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish Physiol Biochem 11:165-173
- 5. Knoeppel S, Atkins D, Packer R. 1982 The role of the thyroid gland in osmotic and ionic regulation in Fundulus heteroclitus acclimated to freshwater and seawater. Comp Biochem Physiol 73A:25-29
- 6. Mancera JM, McCormick S 1999 Influence of cortisol, growth hormone, insuline-like growth factor I and 3,3',5-triiodo-L-thironina hypoosmoregulatory ability in the euryhaline teleost Fundulus heteroclitus. Fish Physiol Biochem 21:25-33
- 7. Subash Peter M, Lock R, Wendelaar Bonga S, 2000 Evidence of an osmoregulatory role of thyroid hormones in the fresh water Mozambique tilapia Orechromis mossambicus. Gen Comp Endocrinol 120:157-167
- 8. Scott-Thomas DAF, Ballantyne JS, Leatherland JF, 1992 Interactive effects of high stocking density and triiodothyronine-administration on aspects of the in vivo intermediary metabolism and in vitro hepatic response to catecholamine and pancreatic hormone stimulation in brook charr, Salvelinus fontinalis. J Exp Zool. 263:68-82
- 9. Woo NYS, Chung ASB, Ng TB, 1991 Influence of oral administration of 3,5,3'-triiodo-L-tyronine on growth, digestion, food conversion and metabolism in the undervearling red sea bream, Chrysophrys major. J Fish Biol 39:459-468

EFECTO DEL TERMOPERIODO SOBRE LA MADURACIÓN Y LOS NIVELES DE ESTEROIDES SEXUALES EN EJEMPLARES CULTIVADOS DE LENGUADO SENEGALÉS Solea senegalensis (KAUP, 1858)

A. García-López, C. Sarasquete, G. Martínez-Rodríguez

Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía. CSIC. Pto. Real, Cádiz. España.

RESUMEN. La manipulación de la temperatura del agua mostró una influencia clara sobre el ciclo reproductor de *Solea senegalensis*, afectando tanto a la producción de esteroides como al desarrollo gonadal. Esto corrobora los datos anteriores que sugerían una importante dependencia térmica de los procesos reproductivos en la especie, si bien la misma parece producirse desde los estadios iniciales del desarrollo gonadal y no sólo durante la maduración final, ovulación y puesta.

INTRODUCCIÓN

El fotoperiodo se considera el principal factor que controla la reproducción en la mayoría de los peces teleósteos de latitudes medias (1). En muchas especies, el termoperiodo también jugaría un papel relevante, actuando en la regulación de la maduración de los gametos, de la ovulación y de la puesta. Este parece ser el caso de *S. senegalensis* (2, 3), aunque hasta la fecha los estudios sistemáticos enfocados sobre la influencia de la manipulación del termoperiodo sobre su ciclo reproductor son muy escasos. Estos estudios permitirían profundizar en el conocimiento del control ambiental de la reproducción de esta especie, lo que sería de vital importancia para superar las disfunciones reproductivas encontradas en cautividad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado un seguimiento mensual bajo diferentes regímenes fototérmicos de la maduración en las hembras (escala F1 → F4 en función del tamaño aparente del ovario), de la espermiación en los machos (machos fluyentes [RM] y no fluyentes) y de los niveles plasmáticos de los esteroides sexuales estradiol (E₂), testosterona (T) y 11-cetotestosterona (11-KT) (ELISA; 4) en diferentes grupos de reproductores de S. senegalensis nacidos en cautividad (F1; 1999). En un primer experimento (octubre 03-junio 04), bajo fotoperiodo natural (NP) o luz continua (LL), se testó la influencia de un descenso y posterior ascenso progresivo de la temperatura (t1; 19 °C [diciembre] → 10 °C [enero, 1 semana] → 19 °C [febrero]). En un segundo experimento (noviembre 04-junio 05) bajo NP se sometió a los peces a un descenso-ascenso térmico brusco (t2; [7 días, enero]: 19 °C → 10 °C [1 día] → 19 °C) o a varios (t3; diciembre [5 días], 19 °C \rightarrow 14 °C [1 día] \rightarrow 19 °C; enero, igual a t2; febrero, igual a diciembre; marzo [3 días], 19 °C → 16 °C [1 día] → 19 °C). En ambos experimentos se dispuso el control correspondiente sometido al mismo fotoperiodo y a temperatura constante (t0; 19 °C). Los datos fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía, seguido por el test de comparación múltiple SNK (p = 0,05). En los casos necesarios los datos fueron transformados (logaritmo) para cumplir con las condiciones de normalidad y homogeneidad de la varianza.

RESULTADOS

Experimento 1: Bajo NP, t1 no produjo ningún cambio significativo en los niveles de E2 (Figura 1a) y en la proporción de hembras en los estadios F3 y F4, si bien el máximo de E2 se vio retrasado 1 mes. En el caso de la T (Figura 2a), se observó el mismo retraso aunque se alcanzaron niveles significativamente superiores a los de NP-t0. En estas mismas condiciones, en los machos sometidos a t1 se observó una estimulación de la producción de 11-KT y T (Figuras 3a y 4a, respectivamente) lo que se reflejó en una mayor incidencia de RM (febrero-marzo: 47,5 % en NP-t0, 72, 2 % en NP-t1). En las hembras sometidas a LL-t1 se observaron unas concentraciones plasmáticas de E₂ (Figura 1b) superiores a las de LL-t0 (no efecto sobre la T; Figura 2b), lo que se tradujo en una mayor incidencia de ejemplares que comenzaron la maduración (febrero-marzo-abril, F2 + F3 + F4: 38,4 % en LL-t0, 66,7 % en LL-t1). Los machos sometidos a LL-t1 tuvieron unos niveles plasmáticos de 11-KT y T superiores a los de LL-t0 (Figuras 3b y 4b, respectivamente), si bien esto no se tradujo en una mayor ocurrencia de RM.

Experimento 2: Como resultado de ambas modificaciones térmicas (t2 y t3), las hembras mostraron una mayor concentración sérica de E2 y T (Figuras 1c y 2c, respectivamente), aunque esto no produjo un aumento en la proporción de ejemplares en estadios F3 y F4. En los machos, no se observaron cambios significativos ni en los niveles de 11-KT (Figura 3c) ni en la proporción de RM, si bien los de T se vieron incrementados (Figura 4c).

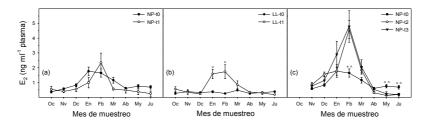


Figura 1. Cambios mensuales en los niveles plasmáticos de E2 (media ± S.E.M.) en hembras cultivadas de S. senegalensis bajo diferentes regímenes foto-térmicos (ver texto). En (a) y (b), * indica diferencia significativa en un mismo mes entre los regímenes. En (c), las diferencias significativas en un mismo mes entre t0 y t2 se marcan con *, mientras que entre t0 y t3 se señalan con ^.

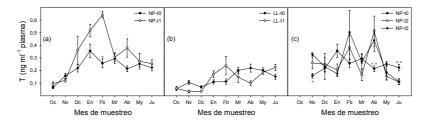


Figura 2. Cambios mensuales en los niveles plasmáticos de T (media ± S.E.M.) en hembras cultivadas de S. senegalensis bajo diferentes regímenes foto-térmicos (ver texto). En (a) y (b), * indica diferencia significativa en un mismo mes entre los regímenes. En (c), las diferencias significativas en un mismo mes entre t0 y t2 se marcan con *, mientras que entre t0 y t3 se señalan con ^.

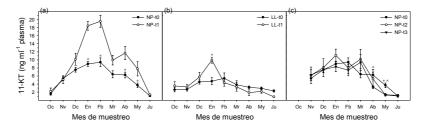


Figura 3. Cambios mensuales en los niveles plasmáticos de 11-KT (media ± S.E.M.) en machos cultivados de S. senegalensis bajo diferentes regímenes foto-térmicos (ver texto). En (a) y (b), * indica diferencia significativa en un mismo mes entre los regímenes. En (c), las diferencias significativas en un mismo mes entre t0 y t2 se marcan con *, mientras que entre t0 y t3 se señalan con ^.

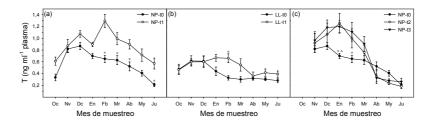


Figura 4. Cambios mensuales en los niveles plasmáticos de T (media ± S.E.M.) en machos cultivados de S. senegalensis bajo diferentes regímenes foto-térmicos (ver texto). En (a) y (b), * indica diferencia significativa en un mismo mes entre los regímenes. En (c), las diferencias significativas en un mismo mes entre t0 y t2 se marcan con *, mientras que entre t0 y t3 se señalan con ^.

DISCUSIÓN

La manipulación de la temperatura del agua mostró una influencia clara sobre el ciclo reproductor en cautividad de S. senegalensis, afectando tanto al desarrollo gonadal como a su regulación hormonal.

Bajo LL aunque no bajo NP, el descenso-ascenso progresivo de la temperatura durante el invierno (t1) aumentó los niveles plasmáticos de E2 lo que promovió el comienzo de la maduración en las hembras durante la primavera siguiente. En los machos, t1 estimuló la producción de esteroides y esperma bajo ambos fotoperiodos (en LL en una menor extensión). Estas observaciones sugieren que el descenso de las horas de luz al día sería la principal señal que modularía el comienzo de la maduración, si bien en ausencia de éste un descenso térmico podría provocar en los animales el mismo efecto. La conjunción de ambos factores (NP-t1) estimuló la maduración en los machos, indicando la mejor aproximación a las supuestas condiciones idóneas (naturales). En las hembras, no pareció producirse esta estimulación, si bien esta podría haberse expresado mediante cambios no perceptibles con nuestra estrategia de muestreo.

Los parámetros estudiados no mostraron ninguna variación entre uno (t2) y varios choques térmicos (t3) durante el invierno y el comienzo de la primavera. ya que ambos aumentaron la producción de E2 en hembras y de T en ambos sexos, si bien esto no se vio reflejado en un aumento de la maduración o de la espermiación. Este hecho podría indicar que enero sería un periodo clave para el desarrollo gonadal, siendo suficiente una señal térmica en este momento para estimularlo.

Nuestros resultados corroboran los trabajos anteriores, que apuntaron una clara dependencia térmica de los procesos reproductivos en la especie, si bien esta dependencia parece extenderse no solo a la maduración final, ovulación y puesta (2,3) sino también a las fases iniciales de la maduración gonadal. Son necesarias futuras investigaciones para confirmar esta hipótesis, así como para dilucidar la influencia precisa del termoperiodo y del fotoperiodo sobre los diferentes niveles del eje cerebro-hipófisis-gónada.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto AGL2000-0179-P4-02) A.G.L. disfruta de una beca del CSIC (I3P-BPD-2001-1; Programa I3P; Fondo Social Europeo). Los autores agradecen a José Luis Coello, María Francisca Osta y Carmen Maria Álvarez por su inestimable ayuda en el cuidado y muestreo de los animales y en la realización de los análisis de los esteroides.

- 1. Bromage NR, Porter MJR, Randal CF 2001. The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. Aquaculture 197: 63-98
- 2. Anguis V, Cañavate, JP 2005. Spawning of captive Senegal sole (Solea senegalensis) under a naturally fluctuating temperature regime. Aquaculture 243: 133-145
- 3. Dinis MT, Ribeiro L, Soares F, Sarasquete C 1999. A review on the cultivation potential of Solea senegalensis in Spain and in Portugal. Aguaculture 176: 27-38
- 4. Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M 2000. Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: Effect of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (Dicentrarchus labrax, L.) at puberty. Fish Physiol Biochem 23: 141-150

REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS ENERGÉTICA POR MELATONINA EN EL CARPÍN DORADO (Carassius auratus)

R.M. Martínez-Álvarez, N. De Pedro, A.L. Alonso-Gómez, E. Isorna, M.J. Delgado

Dpto. Fisiología (Fisiología Animal II), Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid. España.

RESUMEN. Estudiamos los efectos de la melatonina sobre el peso corporal y las reservas metabólicas del carpín dorado, así como las posibles interacciones con otros reguladores centrales y periféricos de la ingestión de alimento. Asimismo, hemos analizado las posibles modificaciones de la actividad locomotora diaria. El tratamiento crónico con melatonina reduce significativamente el peso corporal en esta especie, sugiriendo la intervención de esta hormona en la regulación periférica del peso corporal a través de una activación periférica de la saciedad. Proponemos también, la implicación de la indolamina en la movilización de las reservas lipídicas. La melatonina participa en el control de los ritmos diarios de actividad locomotora en el carpín dorado, actuando como un claro depresor de su actividad.

INTRODUCCIÓN

Actualmente se acepta que la ingestión de alimento en los vertebrados está bajo el control de un sistema central que funcionaría en combinación con un sistema periférico, principal regulador de la saciedad (1). La regulación central de la ingesta se basa en el balance ejercido por numerosos neuropéptidos y monoaminas, mientras que en la regulación periférica intervienen varios péptidos y hormonas gastrointestinales. Estas señales, centrales y periféricas, pueden actuar estimulando la ingestión de alimento (factores orexigénicos) o bien inhibiendo el apetito (factores anorexigénicos). En los últimos años, se ha demostrado el papel estimulador e inhibidor de la ingesta de varios neuropéptidos y hormonas en peces, tales como la ghrelina, que estimula la ingesta, y la leptina y la melatonina (MEL), ambas con acción anoréxica. La MEL se sintetiza en la glándula pineal y la retina de los vertebrados y actúa como señal neuroendocrina capaz de transducir la información luminosa y sincronizar distintas actividades rítmicas con el fotoperiodo diario. Se han detectado altas concentraciones de MEL y sitios de unión específicos para esta hormona en el tracto gastrointestinal de ciertos vertebrados, lo que sugiere una posible interacción funcional entre esta indolamina y el sistema digestivo. Estudios previos en el carpín dorado describen un efecto anoréxico in vivo de la MEL y su agonista 2-iodoMEL mediado por receptores periféricos específicos para la hormona (2). Una reducción similar de la ingesta inducida por la MEL se ha encontrado posteriormente en otras especies de teleósteos (3). En la actualidad desconocemos si este efecto inhibidor de la alimentación se ejerce de forma directa, actuando como un regulador local del tracto gastrointestinal, o bien de forma indirecta, a través de la interacción con otros reguladores del comportamiento alimentario. En este estudio analizamos los efectos de un tratamiento crónico con MEL sobre el peso corporal y las reservas metabólicas del carpín, así como las posibles interacciones con otros reguladores, centrales y periféricos, de la ingesta. Asimismo, realizamos registros de actividad locomotora con el fin de detectar posibles modificaciones de este parámetro rítmico durante el tratamiento crónico con MEL.

MATERIAL Y MÉTODOS

- 1. Diseño experimental. Los peces se dividieron en dos grupos (n=10/grupo; peso medio inicial=40,9±1,4 g) que fueron inyectados intraperitonealmente (IP) durante 10 días con solución salina de teleósteos (10 µl/g peso corporal) (control), y con MEL (10 µg/g peso corporal). Los peces fueron alimentados al 2% del peso corporal a las 11:00 h e inyectados 1 h antes del inicio de la fase oscura (fotoperiodo 12L:12D, luz 7:00-19:00 h). Se realizaron determinaciones del peso corporal y registros de la actividad locomotora diariamente, y al final del experimento (tras 24 h de ayuno) se pesó a los peces y se obtuvieron muestras de sangre. Se extrajeron el hipotálamo, el hígado, las gónadas y la grasa perivisceral, y se tomaron muestras de músculo. La actividad locomotora se registró mediante fotocélulas infrarrojas adheridas a las paredes de los acuarios. El número de interrupciones del rayo infrarrojo se midió a intervalos de 10 min durante ciclos de 24 h mediante un software específico.
- 2. Métodos analíticos. Se calcularon los índices hepatosomático (IHS), gonadosomático (IGS) y el índice de adiposidad (IG) Índice = (Ph/Pc) × 100; Ph= peso húmedo del hígado, gónada o grasa; Pc= peso corporal. La glucosa y los triglicéridos plasmáticos se determinaron con métodos enzimáticocolorimétricos. Los niveles circulantes de leptina y ghrelina, así como el contenido hipotalámico de neuropéptido Y (NPY) se determinaron por RIA. La cuantificación de las monoaminas hipotalámicas (adrenalina, noradrenalina; dopamina y su principal metabolito, el ácido 3,4-dihidroxifenilacético; y serotonina y su principal metabolito, el ácido 5-hidroxindolacético) se realizó mediante HPLC-ED. El contenido hepático y muscular de glucógeno, lípidos y proteínas se determinó por espectrofotometría.

RESULTADOS

La administración crónica IP de MEL a una dosis de 10 µg/g peso corporal produjo una disminución significativa de la ganancia de peso en comparación con el grupo invectado con salino. Esta reducción se observó a partir del segundo día de tratamiento (Fig. 1a).

No se observaron diferencias significativas en los valores del IHS, IGS e IG entre los peces inyectados con salino (3,04±0,15, 1,27±0,36 y 1,1±0,2 %, respectivamente) y los tratados con MEL (2,76±0,21, 1,32±0,45 y 0,89±0,24 %). Los triglicéridos plasmáticos fueron significativamente (P<0,05) inferiores en los peces tratados con MEL (189,76±20,56 mg/dl) que en los controles (239,67±13,16 mg/dl), mientras que la glucemia no mostró diferencias estadísticas entre ambos grupos (65,24±4,45 y 69,31±10,76 mg/dl en los inyectados con salino y MEL, respectivamente). La MEL no modificó el glucógeno hepático de los peces tras 10 días de tratamiento mientras que el glucógeno muscular presentó valores significativamente menores (P<0,05) en los peces inyectados con MEL (9,04±1,17 µg/mg tejido) frente a los controles (13,16±1,11µg/mg tejido). Los lípidos hepáticos muestran una reducción significativa de sus valores (P<0,05; controles: 357,02±32,4;MEL: 239,75±35,6 ng/mg tejido), mientras que en músculo no hubo cambios. El contenido proteico en hígado y músculo no varió tras el tratamiento. Los niveles circulantes de leptina (controles: 32,24±1,16; MEL: 34,8±2,3 ng/ml) y ghrelina (controles: 516,1±83,32; MEL: 417,6±76,03 pg/ml) no se modificaron significativamente tras el tratamiento con MEL, al igual que el contenido

hipotalámico de monoaminas y NPY (controles: 4,83±0,36; MEL: 4,87±0,55 ng NPY/hipotálamo). La actividad locomotora total de los peces se redujo significativamente tras 7 días de administración crónica IP de MEL (Fig. 1b). Los peces inyectados con salino mostraron un ritmo diario de actividad claramente diurno, mientras que los peces tratados con MEL presentaron una alteración de dicho ritmo (Fig. 2).

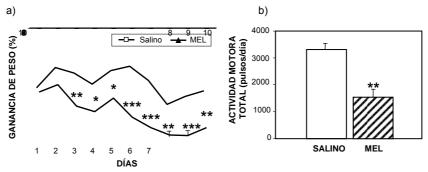


Figura 1. a) Efecto del tratamiento IP con melatonina (MEL, 10 μg/g peso corporal) durante 10 días, sobre el peso corporal de C. auratus (n=10/grupo; *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 respecto al grupo inyectado con salino en el mismo día). b) Actividad locomotora total diaria tras la inyección IP de MEL (10 µg/g peso corporal) durante 7 días en C. auratus (**P<0,01).

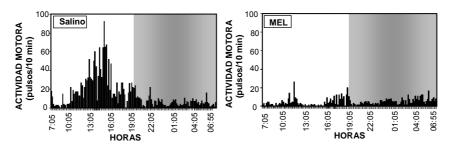


Figura 2. Efecto de la administración crónica de melatonina (MEL, inyección diaria IP 10 µg/g peso corporal) sobre el ritmo diario de actividad locomotora en C. auratus. Los datos corresponden al día 6 del experimento.

DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos encontrado que la administración crónica (10 días) IP de MEL produce una reducción del peso corporal en el carpín dorado. Estos resultados son los primeros que se publican en peces sobre el efecto de la MEL en el peso corporal y concuerdan con la acción anoréxica de esta hormona descrita en éste (2) y otros teleósteos (3). En los mamíferos, se han descrito efectos contradictorios sobre el papel de la MEL en la regulación del peso corporal dependiendo de la especie estudiada, no existiendo en la actualidad otros estudios acerca del papel de la MEL sobre la ingesta y el peso corporal en otros ectotermos. Resulta complejo comparar los resultados obtenidos en peces con los publicados en los mamíferos, en los que funciones como la termogénesis y la hibernación, que conllevan un elevado requerimiento nutricional, son reguladas por la propia MEL. A partir de

nuestros resultados, sugerimos que la MEL puede intervenir en la regulación periférica del peso corporal en el carpín, posiblemente a través de una activación periférica de la saciedad. Esta hipótesis se apoya en estudios previos en esta misma especie, en los que encontramos una reversión del efecto anoréxico de la MEL con la administración periférica de su antagonista luzindol (2), y en la existencia de sitios de unión de alta afinidad para la hormona en el tracto gastrointestinal de la tenca (Tinca tinca) (4). Las reducciones de los triglicéridos plasmáticos y de los lípidos hepáticos con la administración de MEL pueden deberse bien a las menores ingesta y peso corporal observados durante el tratamiento, o bien, a una posible acción directa de esta hormona sobre ambos compuestos. En todo caso, se produce una regulación de la movilización de las reservas lipídicas por MEL en esta especie. La conservación de la glucemia al final del tratamiento, puede justificarse en base a la movilización del glucógeno muscular en los peces tratados frente a los controles. Sin embargo, el contenido de glucógeno hepático, aún siendo más abundante que el muscular, no se ve alterado por la MEL. Esta distinta respuesta de ambas reservas de carbohidratos a la MEL debe ser investigada con el fin de dilucidar los mecanismos que subvacen a esta diferencia. El presente estudio es el primero que contempla la interacción entre MEL y distintos reguladores de la ingesta centrales (NPY y momoaminas hipotalámicas) y periféricos (ghrelina y leptina) en el control del peso corporal en los peces. De nuestros resultados se podría deducir que el efecto de la MEL IP sobre el peso corporal en el carpín no está mediado por estos reguladores, aunque en los mamíferos se ha sugerido que la MEL, la leptina y la ghrelina están interrelacionadas en la regulación de la ingesta. Sin embargo, no podemos descartar que otros factores (dosis, época del año, tamaño corporal...) estén afectando a estas posibles interacciones entre distintos reguladores de la ingesta. Por último, nuestros resultados muestran una reducción de la actividad locomotora en esta especie durante el tratamiento con MEL, corroborando lo descrito en otros teleósteos (3,5). Además, la alteración del patrón rítmico diario de actividad nos indica que la MEL está implicada en el control de los ritmos de actividad en el carpín, actuando como un claro depresor de la actividad motora en este teleósteo.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MEC (proyecto AGL2004-1837-C04-01).

- 1. De Pedro N, Björnsson BT 2001 Regulation of food intake by neuropeptides and hormones. In Food intake in fish. Eds D Houlihan, T Boujard, M Jobling. Oxford (UK): Blackwell Science. pp 269-296
- 2. Pinillos ML, De Pedro N, Alonso-Gómez AL, Alonso-Bedate M, Delgado MJ 2001 Food intake inhibition by melatonin in goldfish (Carassius auratus). Physiol Behav 72:629-634
- 3. López-Olmeda JF, Madrid JA, Sánchez-Vázquez J 2004 Melatonin effects on feeding and locomotor activity rhythms in diurnal (goldfish) vs nocturnal (tench) fish under different light conditions. V International Symposium on Fish Endocrinology. Castellón, P53
- 4. López-Patiño MA 2004 Receptores centrales y periféricos de melatonina en el teleósteo *Tinca tinca*. Caracterización, farmacología y ritmicidad diaria y estacional. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- 5. Zhdanova IV, Wang SY, Leclair OU, Danilova NP 2001 Melatonin promotes sleep like state in zebrafish. Brain Res 903:263-268

ACCIONES DE LA PROLACTINA Y LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN EL METABOLISMO ENERGÉTICO Y LA OSMORREGULACIÓN DE LA DORADA (Sparus auratus)

S. Sangiao-Alvarellos 1 , F.J. Arjona 2 , S. Polakof 1 , J.M. Míguez 1 , M.P. Martín del Río 2 , J.M. Mancera 2 , J.L. Soengas 1

¹Laboratorio de Fisioloxía Animal, Facultade de Ciencias do Mar, Universidade de Vigo, 36310 Vigo, España, ²Dpto. Biología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, 11510 Puerto Real, Cádiz, España.

RESUMEN. Doradas inmaduras se inyectaron intraperitonealmente con implantes de liberación lenta de aceite vegetal solo o conteniendo hormona de crecimiento ovina (oGH) o prolactina ovina (oPRL). Después de siete días se sacrificaron los animales y se tomaron muestras para medir parámetros metabólicos y osmorreguladores. A nivel osmorregulador el tratamiento con oGH aumentó la capacidad hipoosmorreguladora. En hígado incrementó el potencial de movilización de glucógeno y la capacidad de exportar glucosa, descendió el potencial glucolítico y la capacidad para usar lactato y lípidos como combustible. En branquias aumentó la capacidad para usar glucosa exógena y la glucolítica. En riñón estimuló el potencial glucogenolítico, incrementó el uso de glucosa exógena y la capacidad glucolítica. Por último. en cerebro aumentó el potencial glucogenolítico. Por su parte, el tratamiento con oPRL provocó: i) un descenso hepático del potencial de oxidación de lípidos, ii) aumento de los niveles de glucosa en branquias, iii) mayor uso de glucosa exógena y capacidad para exportarla en el riñón, y iv) aumento del potencial para el uso de glucosa exógena en cerebro.

INTRODUCCIÓN

Varias hormonas como el cortisol, GH y PRL, con un claro papel en la adaptación osmótica también juegan un papel en la movilización de sustratos energéticos en teleósteos. Puesto que la adaptación osmótica es un proceso con un coste energético elevado, aquellas hormonas que influyen en la adaptación a distintas salinidades ambientales lo pueden hacer indirectamente a través de sus efectos sobre el metabolismo. Desde un punto de vista osmorregulador, la GH facilita la adaptación a agua de mar en varias especies de salmónidos, mientras en no salmónidos su papel osmorregulador depende de la especie estudiada. A nivel metabólico, la GH es lipolítica en varias especies de peces (5), aumenta la síntesis proteica (1) y en algunas especies produce hiperglucemia (3). La PRL presenta diversas funciones relacionadas con el balance iónico y de agua, crecimiento, desarrollo, metabolismo, comportamiento, reproducción e immunorregulación. A nivel osmorregulador, la PRL juega un importante papel durante la adaptación de distintas especies a agua dulce o salinidades bajas. Sorprendentemente, existen pocos estudios sobre los efectos de la PRL en el metabolismo energético, describiéndose algún efecto en el metabolismo lipídico (3), y muy pocos resultados sobre el metabolismo de los carbohidratos (4). El presente estudio fue diseñado para determinar los efectos de la GH y PRL en parámetros osmorreguladores y energéticos de la dorada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos se llevaron a cabo con doradas inmaduras (Sparus auratus L.) adaptadas a agua de mar (40 ‰, 1162 mOsm/kg). Los animales fueron inyectados intraperitonealmente con implantes de liberación lenta de aceite vegetal solo o conteniendo oGH u oPRL a una dosis de 5µg/g de peso corporal. 7 días después del implante se sacrificaron y se tomaron muestras para evaluar parámetros osmorreguladores y metabólicos. También se sacrificaron animales inyectados solo con aceite y sin inyectar. El plasma se obtuvo después de centrifugar la sangre. Los niveles de cortisol en plasma se midieron por ELISA. Se tomaron muestras de hígado, branquias, cerebro y riñón para evaluar cambios en parámetros metabólicos y osmorreguladores, según procedimientos descritos previamente. Los datos se trataron estadísticamente con ANOVA de una vía (P<0.05).

RESULTADOS

En la Tabla I se muestran los resultados estadísticamente significativos, mientras el resto ha sido omitido. Tras el tratamiento con oGH descendieron los niveles de sodio y la osmolalidad en plasma, mientras que el tratamiento con oPRL provocó un aumento en los niveles de sodio plasmático. El tratamiento con oGH aumentó significativamente la actividad Na⁺,K⁺-ATPasica branquial y disminuyó los niveles de lactato en plasma, mientras que los niveles de proteína plasmática descendieron tanto con el tratamiento con oGH como con oPRL. En hígado, la oGH incrementó el porcentaje de forma activa de la GPasa y la actividad G6Pasa, mientras que la actividad óptima PFK, las actividades FBPasa, Ala-AT, Asp-AT, GDH, HOAD, LDH-O y los niveles de glucógeno descendieron. El único cambio significativo que provocó el tratamiento con oPRL fue una disminución en la actividad HOAD. En branquias la oGH estimuló la actividad óptima PK y la actividad HK, mientras que la oPRL indujo un aumento de los niveles de glucosa. En riñón, el tratamiento con oGH aumentó la actividad GPasa total, la actividad óptima y el ratio de actividad PK y las actividades HK y G6PDH, al mismo tiempo que descendieron los niveles de glucógeno. Por otra parte el tratamiento con oPRL disminuyó el ratio de activación del cofactor PK, y aumentó las actividades HK y G6Pasa. Finalmente, en cerebro, la oGH disminuyó el ratio de actividad y el ratio de activación del cofactor de la PK, así como los niveles de glucógeno y aumentó la actividad de HK y los niveles de glucosa. Mientras el tratamiento con oPRL produjo un aumento en los niveles de glucosa así como en las actividades HK y G6PDH.

DISCUSIÓN

Efectos de la oGH. El aumento en la actividad Na⁺,K⁺-ATPasica branquial y la disminución de la osmolaridad y sodio plasmático están reflejando un aumento de la capacidad hipoosmorreguladora que coincide con el papel de la GH durante la aclimatación a agua de mar. En hígado se observó un descenso en los niveles de glucógeno, así como un aumento significativo en la actividad GPasa, sugiriendo un aumento del potencial glucogenolítico. Por los resultados obtenidos parece que el potencial gluconeogénico en el hígado disminuyó tras el tratamiento hormonal. Los cambios observados en las actividades de las transaminasas y la GDH sugieren una reducción en el catabolismo de amino ácidos reforzando la hipótesis de una reducción en el flujo gluconeogénico. El aumento de la movilización de residuos glucosil desde las reservas de glucógeno podría ser lo esperado para estimular la capacidad del hígado para exportar glucosa, como se demostró por el aumento de la

actividad G6Pasa. El resto de parámetros metabólicos ensayados en el hígado apuntan a un descenso en el potencial glucolítico de este tejido. Los peces tratados con oGH incrementaron la capacidad de las branquias para fosforilar glucosa exógena, que podría usarse para proporcionar el ATP necesario para sustentar el aumento de la actividad Na⁺,K⁺-ATPasica observado tras el tratamiento con oGH, además, el aumento del potencial glucolítico apoya estos datos. En riñón, la mayor actividad HK de los peces tratados con oGH indica un aumento en la capacidad para fosforilar glucosa exógena dentro de este tejido. El incremento de la disponibilidad de glucosa en el riñón podría exportarse al plasma o ser usada in situ. Puesto que la actividad de la G6Pasa no mostró ningún cambio significativo en los peces tratados con oGH la segunda posibilidad parece más probable de acuerdo con el aumento visto en la actividad PK. En cerebro aumentó el potencial glucogenolítico en los peces tratados con oGH, así como un marcado incremento en la capacidad de este órgano para fosforilar glucosa exógena.

Tabla I. Actividades enzimáticas en los distintos tejidos estudiados (GP, glucógeno fosforilasa; PFK, fosfofructoquinasa; FBPasa, fructosa bifosfatasa; G6PDH, glucosa-6fosfato deshidrogenasa; Asp-AT, aspartato aminotransferasa; Ala-AT, alanina aminotransferasa; GDH, glutamato deshidrogenada; HOAD, 3-hidroxiacil-CoAdeshidrogenasa; LDH-O, lactato deshidrogenasa sentido oxidasa; PK, pivruvato quinasa; HK, hexoquinasa; Na⁺,K⁺-ATPasa), niveles de metabolitos (glucógeno, lactato y glucosa) y valores de Na⁺, osmolaridad, proteínas y lactato en plasma. Letras distintas indican diferencia significativas (P<0.05) entre grupos

-		Tratamiento(5 μg	.g ⁻¹ peso corporal)
Parámetro	Vehículo	oGH	oPRL
% GP forma activa hígado	31.6 ± 0.54 a	35.9 ± 0.69 b	32.6 ± 1.04 a
Actividad óptima PFK hígado	$0.72 \pm 0.04 a$	$0.62 \pm 0.01 b$	$0.73 \pm 0.02 a$
Actividad FBPasa hígado	$0.89 \pm 0.05 a$	$0.73 \pm 0.05 b$	$0.80 \pm 0.06 a$
Actividad G6Pasa hígado	6.09 ± 1.22 a	$8.72 \pm 0.73 b$	7.04 ± 0.79 ab
Actividad Asp-AT hígado	3.44 ± 0.14 a	$3.07 \pm 0.12 b$	3.10 ± 0.15 ab
Actividad Ala-AT hígado	3.28 ± 0.15 a	$2.63 \pm 0.18 b$	2.98 ± 0.33 ab
Actividad GDH hígado	13.7 ± 0.45 a	$12.3 \pm 0.39 b$	12.9 ± 0.44 ab
Actividad HOAD hígado	$0.23 \pm 0.03 a$	$0.17 \pm 0.01 b$	$0.18 \pm 0.01 b$
Actividad LDH-O hígado	$0.31 \pm 0.03 a$	$0.22 \pm 0.01 b$	$0.30 \pm 0.05 a$
Niveles glucógeno hígado	623 ± 32.3 a	497 ± 33.9 b	590 ± 43.5 a
Actividad óptima GP branquias	0.13 ± 0.006 a	0.14 ± 0.004 ab	0.15 ± 0.006 b
Actividad óptima PK branquias	5.83 ± 0.22 a	$6.51 \pm 0.18 b$	6.17 ± 0.21 ab
Actividad HK branquias	1.05 ± 0.03 a	$1.15 \pm 0.03 b$	1.10 ± 0.03 ab
Actividad Na ⁺ ,K ⁺ -ATPasa branquial	13.9 ± 1.25a	17.1 ± 1.60b	14.8 ± 1.25ab
Niveles glucosa branquias	$0.29 \pm 0.06 a$	0.27 ± 0.03 a	$0.50 \pm 0.07 b$
Actividad óptima GP riñón	0.09 ± 0.003 a	0.11 ± 0.003 b	0.10 ± 0.004 ab
Actividad óptima PK riñón	$5.59 \pm 0.26 a$	$6.57 \pm 0.22 b$	$5.69 \pm 0.16 a$
Ratio activación PK riñón	0.14 ± 0.01 a	$0.19 \pm 0.01 b$	$0.15 \pm 0.01 a$
Ratio activación F1-6P ₂ riñón	0.50 ± 0.06 a	$0.52 \pm 0.05 a$	$0.41 \pm 0.04 b$
Actividad G6PDH riñón	1.64 ± 0.08 a	1.99 ± 0.11 b	1.79 ± 0.06 ab
Niveles glucógeno riñón	1.12 ± 0.06 a	$0.96 \pm 0.03 b$	1.17 ± 0.04 a
Niveles lactato riñón	1.78 ± 0.12 a	$1.49 \pm 0.21 b$	1.95 ± 0.25 a
Ratio activación PFK cerebro	0.02 ± 0.002 a	0.01 ± 0.002 b	0.02 ± 0.001 a
Ratio activación F2-6P ₂ cerebro	0.07 ± 0.008 a	$0.05 \pm 0.007 b$	$0.08 \pm 0.009 a$
Actividad HK cerebro	$2.07 \pm 0.05 a$	$2.33 \pm 0.03 b$	$2.24 \pm 0.04 b$
Actividad G6PDH cerebro	$0.71 \pm 0.02 a$	0.79 ± 0.02 ab	$0.84 \pm 0.04 b$
Niveles glucógeno cerebro	1.23 ± 0.07 a	$0.99 \pm 0.07 b$	1.11 ± 0.12 ab
Niveles glucosa cerebro	0.89 ± 0.14 a	1.31 ± 0.09 b	$1.27 \pm 0.08 b$
Niveles lactato en plasma	1.99 ± 0.15a	1.62 ± 0.14b	2.02 ± 0.13a
Niveles de proteína en plasma	47.4 ± 1.21a	$43.8 \pm 0.88b$	42.5 ± 1.19b
Niveles Na ⁺ en plasma	175 ± 1.99a	167 ± 1.33b	183 ± 1.72c
Osmolalidad plasmática	359 ± 2.51a	$350 \pm 2.24b$	$358 \pm 0.81a$

La mayor disponibilidad de glucosa dentro del cerebro no se usa aparentemente por la ruta de las pentosas fosfato o el potencial glucolítico (no cambian las actividades G6PDH y PFK). En resumen, el tratamiento con oGH provocó cambios osmorreguladores similares a los que ocurren durante la adaptación hiperosmótica de forma natural y, si tenemos en cuenta que se dieron cambios en diversos parámetros del metabolismo energético, podemos suponer que dicha hormona está implicada en la regulación de cambios en el metabolismo energético asociados con la adaptación hiperosmótica.

Efectos de la oPRL. En el hígado únicamente se observa un descenso en la capacidad de oxidar ácidos grasos. En branquias, la oPRL provocó un descenso en los niveles de glucosa libre, que se pueden asociar a una estimulación en la actividad de la GPasa. En riñón el tratamiento con oPRL aumentó el potencial para el uso de glucosa exógena como se ve por la mayor actividad HK, y dado que no se vieron cambios en los niveles de glucosa libre. parece que la mayoría de esa glucosa se está usando in situ. Además también se observó un aumento en la actividad G6Pasa sugiriendo un incremento del potencial de este tejido para exportar glucosa. El cerebro estimuló su capacidad de usar glucosa exógena tras el tratamiento con oPRL, lo que está relacionado con los mayores niveles de glucosa libre disponible, y este aumento se podría estar usando para obtener poder reductor a través de la ruta de las pentosas fostato como sugiere el incremento visto en la actividad de la G6PDH de los peces tratados con oPRL. En resumen, el tratamiento con oPRL provocó pocos cambios en el metabolismo energético, sugiriendo un papel menor de esta hormona en la regulación del metabolismo energético en doradas adaptadas a agua de mar.

Agradecimientos

Estudio financiado por los proyectos AGL2004-08137-C04-03/ACU (Ministerio de Educación y Ciencia) y PGIDIT05PXIC31202PN (Xunta de Galicia) a J.L.S. v BFU2004-04439-C02-01 (Ministerio Educación v Ciencia) a J.M.M.

- 1. Foster AR, Houlihan DF, Gray C, Medale F, Fauconneau B, Kaushik S. Le Bail PY 1991 The effects of ovine growth hormone on protein turnover in rainbow trout. Gen Comp Endocrinol 82: 111-120.
- 2. Leena S, Shameena B, Oommen OV 2001 In vivo and in vitro effects of prolactin and growth hormone on lipid metabolism in a teleost, Anabas testudineus (Bloch). Comp Biochem Physiol 128B: 761-766.
- 3. Leung TC, Ng TB, Woo NYS 1991. Metabolic effects of bovine growth hormone in the tilapia Oreochromis mossambicus. Comp Biochem Physiol 99A: 633-636.
- 4. Mancera JM, Laiz-Carrión R, Martín del Río MP 2002 Osmoregulatory action of PRL, GH and cortisol in the gilthead sea bream (Sparus auratus L.). Gen Comp Endocrinol 129: 95-103.
- 5. Sheridan MA 1986 Effects of thyroxin, cortisol, growth hormone, and prolactin on lipd metabolism of coho salmon, Oncorhynchus kisutch, during smoltification. Gen Comp Endocrinol 64: 220-238.

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DEL RECEPTOR DE CORTISOL EN LA DORADA (Sparus aurata)

L. Acerete, S. MacKenzie, L. Tort

Dpto. Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad Autónoma de Barcelona. España.

RESUMEN. Las hormonas corticosteroideas son esenciales para la regulación de una gran variedad de procesos fisiológicos. El cortisol es el corticosteroide más importante en teleósteos, con funciones glucocorticoideas y mineralocorticoideas. Además, es el principal indicador de la respuesta al estrés y es la principal hormona osmorreguladora en peces, especialmente en la adaptación al agua salada. Los efectos de las hormonas corticosteroideas están regulados a través de receptores intracelulares que actúan como factores de transcripción dependientes del ligando. En el presente trabajo hemos estudiado el receptor glucocorticoide (GR) en la dorada (*Sparus aurata*). Hemos obtenido un cDNA de 500 pb de mRNA del pronefros de la dorada (*S. aurata*), por PCR con cebadores degenerados diseñados a partir del dominio de unión a la hormona (HBD) del GR de tilapia. El nuevo receptor, encontrado en todos los tejidos examinados, muestra elevada homología con otros receptores glucocorticoides.

INTRODUCCIÓN

Las glándulas suprarrenales humanas están formadas por <u>médula suprarrenal</u>, productora de catecolaminas y <u>corteza suprarrenal</u>, productora de hormonas corticoesteroideas. Las principales hormonas corticoesteroideas son: glucocorticoides (cortisol), mineralocorticoides (aldosterona) y esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos y progestágenos).

En los peces teleósteos las células que sintetizan hormonas corticales, se llaman interrenales y están distribuidas en el riñón anterior. El cortisol es el principal glucocorticoide asumiendo también funciones mineralocorticoideas ya que no existen evidencias que los peces sinteticen aldosterona. El cortisol es esencial para una gran variedad de procesos fisiológicos atribuyéndosele múltiples funciones: participa en distintas vías metabólicas (9), es inmunosupresor (5), es antiinflamatorio (7) y regula la resistencia al estrés (1). La secreción de cortisol en peces está regulada por el eje hipotalámicopituitario-interrenal (HPI), equivalente al eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) en mamíferos (9). La respuesta al estrés requiere, para mantener la homeostasis, la interacción neuro-inmuno-endocrina a través comunicaciones paracrinas bidireccionales (5). Esta comunicación es importante en distintas condiciones estresantes, incluida la endotoxemia. La endotoxina de las bacterias gramnegativas o LPS, aumenta la producción de citoquinas humorales e hipotalámicas, que activan el eje HPA (2). En peces, el LPS también aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias que estimulan el eje HPI, aumentando la producción de ACTH y cortisol (8).

Las hormonas corticoesteroideas actúan a través de receptores intracelulares específicos: el receptor de tipo I o mineralocorticoide (MR) y el receptor de tipo II o glucocorticoide (GR). Estos receptores actúan como factores de transcripción dependientes del ligando y pertenecen a una superfamília de receptores de esteroides/tiroides/retinoides (família S/T/R) que comparten una estructura canònica formada por distintos dominios funcionales. En peces,

ambos receptores pueden actuar como receptores de cortisol, regulando procesos celulares diferentes.

Después del estrés, aumentan las concentraciones plasmáticas de cortisol. En el citoplasma, se unirá al receptor glucocorticoide (GR) el cual estaba formando un heterocomplejo con otras proteinas. Una vez activado se unirá, en el núcleo, a los elementos de respuesta al glucocorticoide (GRE) permitiendo la activación transcripcional de genes implicados en la resposta biológica.

El GR puede interferir con factores de transcripción, atenuando su capacidad de inducir la transcripción de genes implicados en la respuesta inflamatoria

MATERIAL Y MÉTODOS

Distribuimos 40 peces de la especie Sparus aurata, (152,10 ± 14,49 g) en dos tanques cuadrados de fibra de vidrio de 300 L de capacidad total. Dos semanas después de la aclimatación, sacrificamos un total de cinco peces por concusión craneal (n=5) para extraer el RNA total de diferentes tejidos: intestino, corazón, hígado, bazo, gónadas, tejido adiposo, branquias, cerebro, riñón anterior y posterior. Usamos 5 μg de RNA de cada tejido para retrotranscribirlo a cDNA. A partir de 2 µl de cDNA de cada tejido, se amplificó el receptor glucocorticoide (GR) por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando cebadores degenerados diseñados a partir del HBD del GR de tilapia, Haplochromis burtoni (6). Los productos de la PCR se comprobaron en un gel de agarosa al 1% con un marcador de peso molecular DNA.

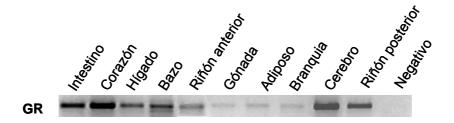
Secuenciamos (Sistemas Genómicos, Valencia) analizamos (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/; http://www.ebi.ac.uk/clustalw) la banda de riñón anterior. El fragmento de riñón anterior se usó como sonda para rastrear una librería de glándula pituitaria de la misma especie, S. aurata, en la Universidade do Algarve (Faro, Portugal).

Posteriormente, diseñamos una nueva pareja de cebadores a partir del clon encontrado, gracias al rastreo de la librería, y a partir del dominio de unión al

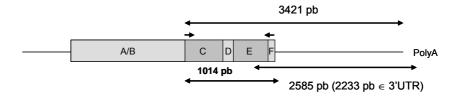
Por último, hicimos un northern quimioluminescente para tener una idea de la distancia que nos faltaba para obtener la secuencia entera del GR de la dorada.

RESULTADOS.

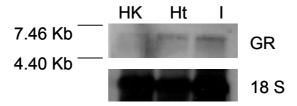
La reacción de PCR nos dio un producto de 500 pb (pares de bases) en todos los tejidos analizados (figura 1).



El rastreo de la librería de cDNA de hipófisis usando el fragmento de riñón anterior como sonda, dio 10 clones positivos. Secuenciamos uno de esos clones obteniendo 2585 pb del GR de la dorada. La pareja de cebadores diseñada posteriormente nos amplificó un fragmento de 1014 pb, que sumadas a las anteriores y restando los fragmentos solapantes, da un total de 3421 pb (figura 2).



El northern quimioluminescente nos dio una banda positiva hacia las 6 Kb en riñón anterior (HK), corazón (Ht) i intestino (I) usando un marcador de peso molecular de RNA (figura 3).



DISCUSIÓN

Los peces no sintetizan aldosterona, así que el cortisol asume funciones glucocorticoideas y mineralocorticoideas. En el momento de empezar el estudio no había constancia de la existencia de un receptor mineralocorticoide (MR) en peces y se creía que las acciones glucocorticoideas y mineralocorticoideas del cortisol se llevaban a cabo únicamente por el receptor glucocorticoide (GR). Estudios recientes han demostrado que los peces también expresan el MR (6, 11).

La reacción de RT-PCR nos dio un producto de 500 pb, correspondiente al GR, en todos los tejidos analizados. Hasta el momento, el GR se ha clonado en trucha, *Oncorhynchus mykiss*, encontrando dos receptores, el GR1 (3) y GR2 (4), el halibut de Japón, *Paralichthys olivaceus* (AB013444), la tilapia de Mozambique, *Oreochromis mossambicus* (12), la tilapia, *Haplochromis burtoni* (6), que tiene tres, GR1, GR2a y GR2b y la lubina, *Dicentrarchus labrax* (AY549305). Es necesario continuar el estudio del receptor de cortisol en la dorada (*S.aurata*) porque es probable que también exprese más de un receptor glucocorticoide.

El rastreo de la librería de cDNA de hipófisis y la siguiente amplificación dieron un clon de 3421 pb del GR de dorada. El alineamiento de nuestra secuencia con la de otras especies de peces teleósteos muestra elevada homología en el dominio de unión a la hormona.

Por último, el northern nos dio una banda positiva de unas 6 Kb , que comparado con el tamaño del GR secuenciado en otras especies de teleósteos (3, 4, 6, 12) indica que nos quedan unas 2,5 Kb para obtener la secuencia completa del GR de la dorada.

- Barton BA 2002 Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integ. and comp. biol.* 42: 517-525.
- 2. Beishuizen A,Thijs LG 2003 Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Journal of Endotoxin Research* 9 (1): 3-24.
- 3. Bury NR, Sturm A, Rouzic PL, Lethimonier C, Ducouret B, Guiguen Y, Robinson-Rechavi M, Laudet V, Rafestin-Oblin ME, Prunet P 2003 Evidence for two distinct functional glucocorticoid receptors in teleost fish. *Journal of Molecular Endocrinology* 31: 141-156.
- Ducouret B, Tujague M, Ashraf J, Mouchel N, Servel N, Valotaire Y, Thompson EB 1995 Cloning of a teleost fish glucocorticoid receptor shows that it contains a deoxyribonucleic acid-binding domain different from that of mammals. *Endocrinology* 136 (9): 3774-3783.
- 5. Engelsma MY, Huising MO, van Muiswinkel WB, Flik G, Kwang J, Savelkoul HFJ, Verburg-van Kemenade BML 2002 Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 87: 467-479.
- Greenwood AK, Butler PC, White RB, DeMarco U, Pearce D, Fernald RD 2003 Multiple corticosteroid receptors in a teleost fish: distinct sequences, expression patterns, and transcriptional activities. *Endocrinology* 144 (10): 4226-4236.
- Haddad JJ, Saadé NE, Safieh- Garabedian B 2002 Cytokines and neuroimmune endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitaryadrenal revolving axis. *Journal of Neuroimmunology* 133: 1-19.
- 8. Holland JW, Pottinger TG, Secombes CJ 2002 Recombinant interleukin-1β activates the hypothalamic-pituitary-interrenal axis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss. Journal of Endocrinology* 175: 261-267.
- 9. Mommsen TP, Vijagan MM, Moon TW 1999 Cortisol in teleost: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9: 211-268.
- 10. Schoneveld OJLM, Gaemers IC, Lamers WH 2004 Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1680: 114–128.
- 11. Sloman KA, Desforges PR, Gilmour KM 2001 Evidence for a mineralocorticoid-like receptor linked to branchial chloride cell proliferation in freshwater rainbow trout. The Journal of Experimental Biology 204: 3953–3961.
- 12. Tagawa M, Hagiwara H, Takemura A, Hirose S, Hirano T 1997 Partial cloning of the hormone-binding domain of the cortisol receptor in tilapia, *Oreochromis mossambicus*, and changes in the mRNA level during embryonic development. *General and Comparative Endocrinology* 108: 132-140.

INDUCCIÓN DE LA MADURACIÓN SEXUAL DE HEMBRAS DE ANGUILA EUROPEA: EXITOS Y FRACASOS

L. Pérez, D.S. Peñaranda, D.L. Garzón, M. Jover y J.F. Asturiano

Grupo de Investigación en Recursos Acuícolas. Dpto. Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia. España.

RESUMEN. Se realizaron dos experimentos para la maduración sexual y la inducción de la puesta de hembras de anguila europea salvajes y de piscifactoría. Los tratamientos combinados de extracto de hipófisis de salmón (SPE) y gonadotropina coriónica humana (hCG) originaron maduración, mientras que la administración de LHRHa, testosterona y pimozide no afectó a las hembras. La inducción de la puesta se realizó con inyecciones de 17,20β-dihidroxi-4-pregnen-3-ona, y en conjunto se obtuvieron 10 puestas flotantes, de las cuales 3 mostraron signos de desarrollo embrionario, aunque no se observaron estados mas avanzados a los de 2 y 8 células, al menos de forma clara.

INTRODUCCIÓN

La anguila europea (*Anguilla anguilla*) presenta un ciclo de vida peculiar, del que aún se desconocen ciertos aspectos, como la localización precisa de la zona de puesta en el mar de los Sargazos, o la profundidad a la que realizan la migración trasatlántica desde las costas europeas, que les supone entre 3000 y 5000 km de recorrido en unos 6 meses. Tanto los machos como las hembras de esta especie comienzan la migración al mar en una etapa de pubertad, con gónadas poco desarrolladas (IGS≤ 1% en las hembras), de modo que las distintas fases de la maduración se producen durante los meses en que viajan hasta la zona de puesta. Esto hace que la maduración inducida sea mas difícil que en otras especies donde únicamente es necesario inducir la maduración final y puesta. En condiciones de laboratorio no se observa de forma espontánea desarrollo gonadal. Esto se debe al bloqueo dopaminérgico que existe a nivel cerebral (1). Sin embargo, si se suministra un tratamiento exclusivo con pimozide (antidopaminérgico) tampoco se observa desarrollo en las hembras de esta especie.

Ohta et al. 1996 (2) desarrollaron un método sencillo para la reproducción de anguila japonesa, que consiste en inyecciones semanales de extracto de hipófisis de salmón (SPE) a una dosis de 20 mg/pez. Si dos días tras la dosis semanal de SPE el índice de peso corporal (peso x 100/peso inicial) supera el 110% se administra una segunda dosis de SPE (20 mg/pez) y 24 h más tarde, una inyección de 17,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP), a una dosis de 2 μ g/g. La DHP induce la ruptura de la vesícula germinal y la ovulación de 15 a 21 h más tarde. Por otro lado, con un tratamiento combinado de testosterona, GnRHa y Pimozide durante 6 semanas se observa (1) un marcado incremento del IGS, del contenido en LH en la hipófisis y plasma, así como de vitelogenina plasmática en hembras de anguila europea. En base a estos trabajos se diseñaron dos experimentos de maduración de hembras de anguila europea, con el objetivo de obtener puestas viables.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el experimento 1 se emplearon 35 hembras salvajes (803 \pm 321 g) capturadas en los canales de salida al mar de la Albufera de Valencia en la época de migración. En el experimento 2 se utilizó un lote de 30 hembras de piscifactoría (705 \pm 15 g) y otro de 11 hembras salvajes (749 \pm 36 g) capturadas en la misma zona. Todos los machos empleados y las hembras de piscifactoría procedían de la empresa Valenciana de Acuicultura, S. A. (Puzol, Valencia). Las hembras se instalaron en tanques de 500 l en penumbra, donde se aclimataron al agua de mar (20-24°C;38 %). Los machos se mantuvieron en acuarios de 96 l en agua de mar. Todos los peces se marcaron con microchips, y no se alimentaron durante los experimentos.

En el experimento 1 las hembras se trataron semanalmente con invecciones que contenían 20 mg de SPE (Sigma Chemicals, Ltd.) y hCG (Farma-Lepori), a una dosis de 1,5 UI/g pez.

En el experimento 2 se emplearon dos tratamientos hormonales en las hembras de piscifactoría. Un grupo se trató con inyecciones semanales de SPE (25.7 mg/kg) y hCG (1.5 IU/g). En el segundo tratamiento se suministró durante las primeras 6 semanas invecciones combinadas de LHRHa (0.1 μg/g), Pimozide (10 μg/g) y testosterona (4 μg/g), y desde la sexta hasta el final del experimento este grupo se subdividió en 2 grupos tratados a) con LHRHa y Pimozide (mismas dosis), y b) invecciones de SPE+ hCG (mismas dosis).

Los machos de los dos experimentos se trataron con inyecciones semanales de hCG (1.5 Ul/g) según el método descrito por Pérez et al. (3). El esperma se extraía 24 h tras la inyección de hCG para obtener la máxima calidad.

El criterio para seleccionar a las hembras para la maduración final fue el incremento de peso, el aspecto del vientre, y el aspecto de los oocitos tras canulación. Dado que las hembras mostraban diferentes estadíos de maduración, se emplearon distintos protocolos para evitar la degeneración de oocitos por sobremaduración de los ovarios. Se emplearon 4 protocolos:

Protocolo 1: Lunes: Inyección semanal (SPE+HCG); Martes (24 h más tarde), dosis de SPE; Miércoles, inyección DHP, 34 h después de la dosis anterior. Protocolo 2: Lunes: Inyección semanal (SPE+HCG); Martes (24 h más tarde), dosis de SPE; Martes, 8-10 horas mas tarde, inyección DHP.

Protocolo 3: Lunes, invección semanal (SPE+ HCG); Lunes, 8-11 h más tarde invección DHP.

Protocolo 4. Lunes, inyección semanal (SPE+HCG); Miércoles (48 h), dosis de SPE; Miercoles (9 h después), invección DHP.

Las inyecciones de DHP se suministraban por la tarde, entre las 18 y las 21h, con el fin de obtener las puestas la mañana siguiente. A partir de 12 horas tras la inyección se examinaban las hembras cada 30 minutos para comprobar si podían liberar oocitos por masaje abdominal. Para la fecundación, se mezclaba esperma (2-3 ml) de 3 ejemplares, y se añadía a los oocitos sin dilución previa. La calidad del semen se había evaluado previamente, y en la fecundación se usaron solo las muestras que presentaron una motilidad visual superior a 50%.

RESULTADOS

Experimento 1. Se obtuvieron puestas de 14 hembras entre la semana 10ª y 15ª de tratamiento. El mayor número de puestas fue en la semana 13ª de tratamiento, con 8 puestas y un total de 12 hembras grávidas. En algunas de las hembras grávidas al observar los oocitos se decidió no iniciar o no completar el protocolo de maduración final, bien porque los oocitos estaban poco desarrollados, o bien, como en las semanas 14-17ª, porque presentaban un alto porcentaje de atresia.

El protocolo 1 sólo se empleó en una ocasión, y originó una puesta flotante y abundante. El protocolo 2 se empleó en 9 hembras, y originó 4 puestas flotantes. El protocolo 3 se ensayó en 2 hembras; una de ellas originó una puesta flotante, y en la otra no se realizó masaje abdominal por aparecer mucha atresia en los oocitos observados tras canulación. El protocolo 4, el más largo, se aplicó a 3 hembras, cuyas puestas, abundantes y fluidas, no resultaron flotantes. La respuesta a la inyección de DHP se produjo entre 12 h 30 min. y 18 h, aunque todas las puestas flotantes se produjeron entre 12 y 15 h tras la inyección.

Experimento 2 . Se emplearon sólo los dos protocolos mas cortos, (2 y 3), para evitar la sobremaduración de oocitos. En conjunto se obtuvieron 4 puestas flotantes, 3 con el protocolo 2, y una con el protocolo 3. En el grupo de hembras de piscifactoría inyectadas con SPE+hCG se seleccionaron 10 hembras para la inducción de la puesta entre las semanas 11ª y 18ª de tratamiento. Cuatro anguilas originaron puestas fecundables, dos de ellas flotantes, entre 13 y 19 h tras la inyección de DHP.

En el grupo de hembras salvajes inyectadas con SPE+hCG se seleccionaron para la inducción de la puesta 5 hembras, 3 de ellas en dos ocasiones, entre las semanas 10^a y 13^a de tratamiento. Se obtuvieron puestas de 4 hembras, aunque sólo se obtuvieron oocitos flotantes en las 2 hembras que respondieron a la inyección de DHP en la primera inducción, en las semanas 10^a y 12^a de tratamiento. Las dos puestas flotantes se obtuvieron 15 h 35 min., y 14 h 45 min. tras la inyección de DHP.

En las hembras de piscifactoría tratadas secuencialmente con LHRHa+, Pimozide+T, seguido de LHRHa+T, no aparecieron signos de maduración externa o interna. Cuatro murieron durante el tratamiento, y las 6 restantes mostraron IGS entre 0.7 y 1% en la semana 16ª de tratamiento.

En las hembras de piscifactoría tratadas con inyecciones de LHRHa+, Pimozide+ T, seguidas por un tratamiento con SPE+hCG se produjeron respuestas al tratamiento. Tras 10-12 semanas de tratamiento con SPE+hCG 2 hembras maduraron, aunque no se indujo la puesta. Un mes tras acabar el tratamiento, 2 de las hembras restantes presentaron IGS elevados, de 37.3 y 32.5 %, mientras que otras dos presentaron IGS de 10 y 12,3 %.

En los dos experimentos sólo se pudo constatar desarrollo embrionario en las puestas de 3 hembras, observándose estados de 2 células y de 8 células. No se observaron estados mas avanzados, al menos bien definidos, a pesar de que el desarrollo de los huevos se siguió con observaciones continuadas hasta que la mayoría de los oocitos cayeron al fondo del incubador.

DISCUSIÓN

El método a de invecciones de CPE o SPE es hasta ahora el único que induce la maduración completa en la anguila europea, pero los resultados no son muy satisfactorios. En el trabajo de Pedersen, (4) el 25 % de las hembras tratadas originó puestas fecundables, porcentaje que aumentó hasta el 39 % en 2004 (5). Palstra et al. (6) obtuvieron puestas en 9 de 23 hembras tratadas hormonalmente. En nuestro grupo solo se han obtenido 10 puestas fecundables, con oocitos flotantes, en los experimentos realizados en 2004 y 2005. Al considerar el desarrollo embrionario de los huevos fecundados el porcentaje de éxito es aún menor. El mayor logro es el de Pedersen (6), que en una de las 9 puestas que obtuvo, el desarrollo embrionario continuó hasta la eclosión, obteniendo una larva que sobrevivió 5 días.

Es necesario mejorar las técnicas y protocolos para la inducción la puesta, ya que se observa una gran incidencia de sobremaduración y atresia que originan un bajo porcentaje de huevos de calidad.

Agradecimientos

Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2003-05362-C02-01), la Generalitat Valenciana (GV01-359, GV04A-508), y la Universidad Politécnica de Valencia (UPV 20030488). La empresa Valenciana de Acuicultura S.A. (Puzol, Valencia) ha colaborado cediendo los ejemplares estudiados. J.F Asturiano cuenta con un contrato del programa Ramon y Cajal, del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

- 1. Vidal, B., Pasqualini, c., LeBelle, N, Holland, M.C., Sbaihi, M., Vernier, P., Zohar, Y., Dufour, S. 2004. Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile european eel: a neuroendocrine look for the onset of puberty. Biology of Reproduction, 71:1491-1500.
- 2. Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Hirose, K. 1996. Changes in fertilisation and hatching rates with time alter ovulation induced by 17,20β-dihidroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, Anguilla japonica. Aquaculture, 139: 191-301.
- 3. Pérez, L., Asturiano, J.F., Tomás, A., Zegrari, S., Barrera, R., Espinós, F.J., Navarro, J.C., Jover, M. 2000. Induction of maturation in the male European eel: assesment of sperm quality throughout treatments. Journal of Fish Biology 57: 1488-1504.
- 4. Pedersen, B.H. 2003. Induced sexual maturation of the European eel Anguilla anguilla and fertilisation of the eggs. Aquaculture 224: 323-338.
- 5. Pedersen, B.H. 2004. Fertilisation of eggs, rate of embryonic development and hatching following induced maturation of the european eel Anguilla anguilla. Aguaculture 237: 461-473.
- 6. Palstra, A.P., Cohen, E.G.H., Niemantsverdriet, P.R.W., van Ginneken, V.J.T., van den Thillart, G.E.E.J.M. 2005. Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. Aquaculture, in press.

ACCIONES OSMORREGULADORAS Y METABÓLICAS DE LA ARGININA VASOTOCINA (AVT) EN LA DORADA (Sparus auratus)

S. Polakof¹, S. Sangiao-Alvarellos¹, F.J. Arjona², M.P. Martín del Río², J.M. Míguez¹, J.L. Soengas¹, J.M. Mancera²

¹Laboratorio de Fisioloxía Animal, Facultade de Ciencias do Mar, Universidade de Vigo, 36310 Vigo, España ²Dpto. Biología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz, 11510 Puerto Real, Cádiz, España.

RESUMEN. La influencia de la arginina vasotocina (AVT) sobre los procesos osmorreguladores y metabólicos en la dorada se evaluó mediante dos experimentales. A corto plazo, se aproximaciones invectaron intraperitonealmente doradas con dos dosis de AVT (0.5 ó 1µg/g peso corporal) y 24 hs. después fueron transferidas a agua de baja salinidad (ABS), agua de mar (AM) y agua hipersalina (AHS). A largo plazo, se inyectaron con 1µg AVT/g peso corporal, se transfirieron a los 3 días a estas salinidades y se muestrearon 3 días después. A nivel osmorregulador, se observaron correlaciones de la dosis de AVT empleada con la osmolalidad plasmática, así como con cambios en la actividad Na⁺,K⁺-ATPasica- branquial, que sugieren un papel de la AVT en la capacidad hipoosmorreguladora. A nivel metabólico destaca el incremento del potencial glucogenolítico hepático y liberación de glucosa al plasma en ejemplares tratados con AVT y transferidos a salinidades extremas.

INTRODUCCIÓN

En teleósteos la AVT juega un papel en el mantenimiento del balance de sales y fluídos, actividad cardiovascular, reproducción, y en los procesos de neurotransmisión y neuromodulación en el sistema nervioso central (1). Cambios osmóticos en el plasma alteran los niveles de AVT (1), lo que sugiere un papel osmorregulador de esta hormona en teleósteos. La dorada (Sparus auratus) es una especie eurihalina en la cual hemos demostrado cambios osmorreguladores y metabólicos durante la aclimatación a ambientes de distintas salinidades (2,3), así como el efecto de varias hormonas sobre los cambios a nivel osmorregulador y metabólico asociados a estas aclimataciones (4). Diferentes hormonas pueden estar involucradas en la interconexión entre la aclimatación osmótica y los cambios en el metabolismo energético. En este sentido, un candidato para regular el metabolismo energético durante los procesos de aclimatación osmótica puede ser la AVT. En este trabajo nos planteamos evaluar el posible papel de la AVT sobre las capacidades osmorreguladoras y metabólicas de la dorada antes y después de la transferencia a distintas salinidades ambientales.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el Experimento 1 doradas inmaduras aclimatadas a AM (38 ‰, 1112 mOsm/kg H $_2$ O) se inyectaron intraperitonealmente con 10 µl·g $^{-1}$ peso corporal de aceite de semilla solo o conteniendo AVT (0.5 ó 1 µg·g $^{-1}$ peso corporal). A las 24 hs. post-inyección, 8 peces por grupo fueron muestreados y el resto transferidos a ABS (6 ‰, 172 mOsm/kg H $_2$ O), AM y AHS (55 ‰, 1474 mOsm/kg H $_2$ O). A las 24 hs. post-transferencia (48hs. post-inyección) todos los animales fueron muestreados. También se utilizaron animales sin inyectar. En el Experimento 2 los peces se inyectaron intraperitonealmente con un

implante de liberación lenta, con 10 μ l·g⁻¹ peso corporal del implante solo o conteniendo AVT (1 μ l·g⁻¹ peso corporal). A los 3 días del implante, 8 peces por grupo fueron muestreados y el resto transferidos a ABS, AM y AHS. A los 3 días post-transferencia, todos los grupos fueron muestreados. La sangre se extrajo del pedúnculo caudal y el plasma se obtuvo por centrifugación de la misma. Las muestras de hígado, branquias, riñón y cerebro fueron utilizadas para evaluar los cambios en parámetros osmorreguladores y metabólicos según procedimientos previamente descritos (3). Se utilizaron ANOVAS de dos y una vía, así como con un test t-Student (P<0.05) para el análisis estadístico.

RESULTADOS

Experimento 1: A **nivel plasmático** existe una correlación positiva entre la osmolalidad y la salinidad ambiental, mientras el Na⁺ descendió en los animales transferidos a ABS (datos no mostrados). Los niveles de triglicéridos aumentaron en los grupos tratados respecto a los controles al comparar los transferidos a ABS con los de AM y AHS (datos no mostrados).

Tabla I. Actividades enzimáticas en doradas aclimatadas a AM tras 3 días de un implante intraperitoneal de aceite vegetal solo (control) o con AVT (1 μg·g⁻¹ peso corporal), seguido de 3 días de aclimatación a ABS, AM o AHS. (GPasa: glucógeno fosforilasa; G6Pasa: glucosa-6-fosfatasa; Na⁺,K⁺ATPasa: sodio,potasio-adenosíntrifosfatasa-).

			Después de transferir		
Enzima	Tratam.	Antes transferir	ABS	AM	AHS
GPasa hepática	Control AVT	0.74 ± 0.06 0.66 ± 0.03	0.61 ± 0.04a 0.84 ± 0.05*ab	0.72 ± 0.05a 0.65 ± 0.05a	0.72 ± 0.08a 0.90 ± 0.06*b
G6Pasa hepática	Control AVT	15.4 ± 2.00 38.8 ± 6.58*	20.9 ± 3.05a 36.3 ± 0.77*b	16.6 ± 1.68ab 14.5 ± 1.70a	9.18 ± 2.12b 31.6 ± 1.66*b
Na ⁺ ,K ⁺ ATPasa branquial	Control AVT	7.22 ± 0.84 5.56 ± 0.91	7.94 ± 0.77a 6.93 ± 0.35b	6.66 ± 0.73a 10.97 ± 0.89a*	2.2 ± 1.41b 12.59 ± 1.28a
Na ⁺ ,K ⁺ ATPasa Renal	Control AVT	21.62 ± 1.50 24.05 ± 1.54	21.33 ± 1.40a 15.40 ± 1.75*b	19.86 ± 1.73a 20.93 ± 2.19ab	21.75 ± 0.94a 20.92 ± 0.82a

Los valores son medias ± EEM (n = 8 peces por grupo). *, diferencias significativas (P<0.05) con respecto al control bajo las mismas salinidades. Distintas letras indican diferencias significativas (P<0.05) entre grupos (AM, ABS y AHS) dentro de cada tratamiento (control y AVT).

Experimento 2: En la Tabla I se muestran cambios en algunas actividades enzimáticas y en la Tabla II cambios en metabolitos. Se observó un aumento de la actividad Na⁺,K⁺-ATPasica- branquial en los animales tratados y mantenidos en AM, mientras que a nivel renal descendió en los grupos tratados con AVT y transferidos a ABS. Los niveles de glucosa y lactato plasmáticos de los animales tratados y transferidos a salinidades extremas aumentaron respecto a los transferidos a AM. En el hígado, las actividades GPasa y G6Pasa fueron mayores en los animales tratados y transferidos a salinidades extremas, mientras que los niveles de glucógeno descendieron en los mismos grupos. Los niveles de glucosa y aminoácidos (datos no mostrados) aumentaron en los animales tratados antes de la transferencia. A nivel branquial los niveles de glucosa se incrementaron en salinidades extremas, mientras que los de aminoácidos aumentaron antes de la transferencia. Los niveles de lactato descendieron al cabo de los 6 días en AM

(datos no mostrados). La actividad PK aumentó antes de la transferencia, y la LDH(o) y GDH lo hizo en ejemplares transferidos a AHS (datos no mostrados). En **riñón**, los niveles de lactato se elevaron en salinidades extremas mientras los de glucosa (datos no mostrados) lo hicieron antes de la transferencia. La actividad HK aumentó antes de la transferencia mientras que la LDH(o) descendió en salinidades extremas (datos no mostrados). En **cerebro**, los niveles de lactato, triglicéridos y glucógeno (datos no mostrados) bajaron antes de la transferencia, mientras que los últimos también aumentaron en salinidades extremas con respecto a los de AM. Los niveles de aminoácidos se incrementaron en AM a los 6 días y la actividad HOAD lo hizo antes de la transferencia (datos no mostrados).

Tabla II. Valores de metabolitos del Experimento 2. Para leyenda ver Tabla I

			Después de transferir		
Parámetro	Tratam.	Antes transferir	ABS	AM	AHS
Glucógeno	Control	494 ± 14.2	477 ± 27.8a	474 ± 26.5a	473 ± 16.9a
hepático	AVT	501 ± 7.6	405 ± 26.3*b	485 ± 25.2a	387 ± 37.7*b
Glucosa	Control	1.18 ± 0.02	1.34 ± 0.06a	1.31 ± 0.06a	1.25 ± 0.06a
hepática	AVT	1.38 ± 0.06*	1.28 ± 0.09a	1.37 ± 0.05a	1.44 ± 0.09a
Glucosa	Control	2.46 ± 0.17	2.37 ± 0.09a	2.27 ± 0.14a	2.68 ± 0.19a
plasmática	AVT	2.39 ± 0.18	3.23 ± 0.19*b	1.97 ± 0.18a	3.56 ± 0.26*b
Glucosa	Control	0.76 ± 0.10	0.91 ± 0.10a	1.08 ± .013a	1.43 ± 0.22a
branquial	AVT	0.89 ± 0.1	1.64 ± 0.22*a	0.90 ± 0.07a	3.07 ± 0.30*b
Lactato renal	Control	2.20 ± 0.28	2.10 ± 0.16a	2.27 ± 0.18a	2.66 ± 0.17a
	AVT	2.07 ± 0.22	2.95 ± 0.32*b	2.07 ± 0.29a	3.31 ± 0.39*b
Lactato	Control	8.53 ± 0.46	6.92 ± 0.41ab	5.99 ± 0.52a	8.20 ± 0.56b
cerebral	AVT	6.97 ± 0.41*	8.37 ± 0.60b	7.30 ± 0.24*a	8.49 ± 0.51b

DISCUSIÓN

Los cambios en la osmolalidad plasmática observados en el Experimento 1 confirman que los ejemplares se encontraban en el período adaptativo, y que el tratamiento con AVT no tuvo ninguna influencia. En el segundo experimento, la AVT aumentó la actividad Na⁺,K⁺-ATPasica branquial al cabo de 6 días en AM, lo que sugiere que la AVT tendría una función durante el período crónico de regulación en la aclimatación hiperosmótica. Por otra parte, el descenso de la actividad Na⁺,K⁺-ATPasica renal en los grupos tratados y transferidos a ABS estaría relacionado con el descenso en el transporte iónico durante el período adaptativo de aclimatación a un ambiente hipoosmótico. A nivel metabólico, la AVT incrementó los niveles de glucosa después de la transferencia a salinidades extremas. Dado que bajo nuevas condiciones de salinidad los órganos osmorreguladores demandan más energía (3), la movilización de reservas hacia estos órganos durante la adaptación osmótica indica un papel de la AVT en la estimulación del metabolismo de los mismos. A **nivel hepático**, el aumento de la actividad G6Pasa sugiere una función metabólica de la AVT, induciendo la liberación de glucosa al plasma. Del aumento de la actividad GPasa y el descenso de los niveles de glucógeno en los animales tratados con AVT y transferidos a salinidades extremas se deduce un aumento de la glucogenolisis debida al tratamiento con AVT. Esta

hormona, además, indujo un descenso en el catabolismo de aminoácidos. En las branquias, incrementó el uso de los aminoácidos como combustible antes de la transferencia, dado el aumento de sus niveles, la capacidad de oxidación de los mismos y la actividad PK. El aumento de los niveles de glucosa en salinidades extremas y de las actividades LDH(o) y GDH en AHS apoyan el uso de lactato y aminoácidos como sustentadores del trabajo osmorregulador en este órgano. En el riñón, la AVT incrementó los niveles de glucosa antes de la transferencia, mientras que disminuyó la actividad HK y el potencial glucolítico. Dado que los niveles de glucógeno no cambian, el origen del incremento en la glucosa estaría en la reducida capacidad glucolítica. Como que no hubo cambios en la actividad LDH(o), el aumento de los niveles de lactato se deben a una mayor captación del mismo. La AVT produce un descenso en el uso de glucosa y lactato, reduciendo la demanda energética del riñón. En cerebro, antes de la transferencia, el aumento del potencial glucogenolítico, de la oxidación de ácidos grasos y el descenso de los niveles de lactato indican que la AVT induce la movilización de reservas. Los niveles de glucógeno descienden, y dado que este órgano aumenta el gasto energético durante la aclimatación a salinidades extremas (3), la AVT podría mediar en estos cambios. En resumen, el tratamiento con AVT produjo un aumento de la capacidad hipoosmorreguladora y cambios metabólicos que pueden estar relacionados con el reparto de energía durante la adaptación osmótica a salinidades extremas.

Agradecimientos

Estudio financiado por los proyectos AGL2004-08137-C04-03/ACU (Ministerio de Educación y Ciencia) y PGIDIT05PXIC31202PN (Xunta de Galicia) a J.L.S. y BFU2004-04439-C02-01 (Ministerio Educación y Ciencia) a J.M.M.

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Kulczykowska E 2001 Responses of circulating arginine vasotocin, isotocin, and melatonin to osmotic and disturbance stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiol Biochem 24:201-206
- Laiz-Carrión R, Guerreiro PM, Fuentes, J. Martín del Rio, MP, Canario, AVM, Mancera, JM 2005 Branchial osmoregulatory response to environmental salinities in the gilthead sea bream, Sparus auratus. J Exp Zool 303A:563-576
- 3. Sangiao-Alvarellos S, Laiz-Carrión R , Guzmán JM, Martín del Río MP, Míguez JM, Mancera JM, Soengas JL 2003 Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *Am J Physiol* 285:R897-907
- Sangiao-Alvarellos S, Laiz-Carrión R, Guzmán JM, Martín del Río MP, Míguez JM, Soengas JL 2005 Actions of 17ß-estradiol on carbohydrate metabolism in liver, gills and brain of gilthead sea bream Sparus auratus during acclimation to different salinities. Marine Biol 146:607-617

REGULACIÓN POR LA TEMPERATURA DE LA RITMICIDAD DE LOS RECEPTORES DE MELATONINA EN LA TENCA (Tinca tinca L.)

M.A. López-Patiño, A.I.Guijarro, E. Isorna, M.J. Delgado, A.L. Alonso-Gómez

Dpto. Fisiología (Fisiología Animal II). Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. España.

RESUMEN. El conocimiento actual de los mecanismos que subyacen a las funciones de la melatonina en los peces es aún muy limitado. En el presente estudio se determinan los cambios diarios y estacionales de los receptores de melatonina en tejidos centrales (telencefalo, diencéfalo, techo mesencefálico, cerebelo y retina) y periféricos (riñón y corazón) de un teleósteo nocturno, la tenca y se analiza el efecto de la temperatura en la regulación de dichos ritmos. Encontramos ritmos diarios significativos de baja amplitud en la densidad relativa de receptores durante el otoño y el invierno), con densidades más elevadas durante la fase luminosa del fotociclo diario. La afinidad no mostró cambios diarios significativos en ninguna de las estaciones. La cinética de la interacción ligando-receptor es altamente termosensible en la retina y el techo óptico, sugiriendo que este factor ambiental es clave en la regulación de la transducción de la señal melatoninérgica, al menos en poiquilotermos.

INTRODUCCIÓN

En la última década se ha relacionado a la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina, MEL), hormona sintetizada principalmente en derivados diencefálicos (glándula pineal y retina), con múltiples funciones neuroendocrinas, siendo considerada como un mediador clave en el sistema circadiano y estacional de los vertebrados. Sin embargo, en la actualidad tenemos un conocimiento muy limitado de los mecanismos precisos que subyacen a sus acciones. Los efectos de la MEL sobre sus órganos diana están mediados por receptores específicos de alta afinidad, identificados, localizados y caracterizados en distintas especies de vertebrados. La funcionalidad de dichos receptores parece estar regulada de forma muy precisa, habiéndose descrito variaciones diarias de densidad y afinidad en algunas especies.

La tenca (*Tinca tinca*) es un teleósteo nocturno que muestra un robusto sistema circadiano y estacional, y una amplia distribución de receptores de MEL tanto en localizaciones centrales como periféricas. En el presente estudio investigamos en primer lugar la posible variación diaria y estacional de los receptores de MEL en tejidos centrales (telencefalo, diencéfalo, techo mesencefálico, cerebelo y retina) y periféricos (riñón y corazón) de la tenca. En segundo lugar, conociendo el papel clave desempeñado por la temperatura en el control de los ritmos de MEL en esta especie, estudiamos el efecto de este factor ambiental sobre la capacidad de unión del ligando y sobre la cinética de la interacción del ligando con el receptor.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ejemplares de *T. tinca* utilizados, procedentes del Centro Nacional de Ciprinicultura "Vegas del Guadiana" (Badajoz), se mantuvieron en condiciones naturales de luz y temperatura en tanques de 5 m³, dotados de sistemas de

aireación y renovación continua de agua. La alimentación (1% peso corporal/día) se realizó de forma continua durante las 24 h del día, con pienso granulado (Dibaq). Para el estudio estacional se muestrearon, en las cuatro estaciones del año, tencas adultas cada 3 h a lo largo de ciclos diarios completos de 24 h, extrayendo el encéfalo, la retina y los tejidos periféricos. Para estudiar el efecto de la temperatura se realizaron dos aproximaciones experimentales. Por un lado se realizó un experimento de aclimatación, con dos grupos de tencas sometidas a dos temperaturas diferentes (5 y 25°C), cuantificando la densidad de receptores en retina, techo óptico y corazón en peces sacrificados a mediodía y a media noche. Por otro, realizamos los ensayos de radioligando a distintas temperaturas de incubación (15, 25 y 30°C). La preparación de los extractos de membranas y los ensayos de ligando se realizaron utilizando 2-[125] liodomelatonina como radioligando según el procedimiento descrito por Isorna y colaboradores (1). Las densidades (Bmax) y las constantes de disociación (Kd) se calculan por regresión no lineal de un modelo logístico de cuatro parámetros. Las constantes de asociación y disociación (K+1, K-1) en los estudios cinéticos se calculan mediante una regresión no lineal, asumiendo un aumento exponencial hasta un máximo de pseudo primer orden para la K+1, y una caída exponencial de primer orden para la K.1. La Kd obtenida a partir de los estudios cinéticos se determina a partir del cociente entre ambas constantes $(Kd = K_{-1}/K_{+1}).$

RESULTADOS

Encontramos ritmos diarios de baja amplitud en la densidad relativa de receptores de MEL en el otoño e invierno, con densidades más elevadas durante la fase luminosa del fotociclo diario en todos los tejidos estudiados. La Figura 1 muestra, como ejemplo, el ritmo diario y estacional de la retina. Estos cambios no van acompañados de variaciones en la afinidad. Además, se observa un aumento progresivo de la densidad media de receptores desde otoño a primavera, tanto en tejidos centrales como en periféricos (corazón).

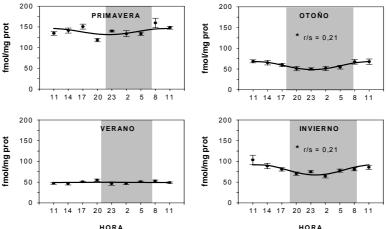


Figura 1. Ritmicidad diaria y estacional en la densidad de receptores de MEL en la retina neural de la tenca. La línea representa el ajuste sinusoidal. La sombreada corresponde a la fase oscura del fotoperíodo diario. *r/s=cociente ruido/señal, significativo.

Tras la aclimatación de las tencas a 5°C y 25°C, sólo se observan variaciones significativas en la densidad de receptores del techo óptico, donde la aclimatación a 25°C produce un aumento significativo de la misma, lo que coincide con el cambio estacional observado en este tejido. La afinidad del ligando por el receptor (Kd) no se modificó significativamente en ninguna de las aproximaciones empleadas.

Aunque la temperatura del ensayo no modifica significativamente ni la capacidad de unión ni la afinidad de los receptores de MEL en ninguno de los tejidos estudiados, las cinéticas de asociación y disociación del ligando al receptor son fuertemente dependientes de la temperatura. La asociación requiere 120, 60 y 40 min a 15, 25 y 30 °C, respectivamente, para alcanzar el estado estacionario. La disociación también es termosensible, el tiempo necesario para desplazar la unión específica disminuye significativamente con el aumento de temperatura, tanto en la retina neural como en el techo óptico. Por el contrario, la respuesta encontrada en el riñón es muy diferente, la saturación de los receptores en este tejido sólo se consigue cuando el ensayo se realiza a 4°C. En cuanto a la cinética de la interacción ligando-receptor en el riñón observamos que sólo se alcanza el equilibrio en ambas cinéticas (asociación y disociación) a 4°C de temperatura, no completándose en ningún caso a 25°C (Tabla I).

Tabla I. Cinéticas de asociación y disociación en extractos de membrana de retina neural, techo óptico y riñón de *Tinca tinca*.

	K ₊₁ 10 ⁻³ (pM ⁻¹ min ⁻¹)	K ₋₁ 10 ⁻³ (min ⁻¹)	Kd _c (pM)
Retina (25°C)	0,72 <u>+</u> 0,04	5,26 <u>+</u> 0,33	7,32
Techo óptico (25	°C) 0,36 <u>+</u> 0,02	2,95 <u>+</u> 0,25	8,15
Riñón (4ºC)	43,02 <u>+</u> 13,32	4027,86 <u>+</u> 1560,96	93,6

DISCUSIÓN

Nuestros resultados demuestran la existencia de variaciones diarias y estacionales en la densidad de receptores de MEL en la tenca, y apuntan hacia un papel de la temperatura como factor ambiental regulador de dicha ritmicidad. Estudios previos en teleósteos sobre variaciones diarias en los receptores de MEL muestran patrones diferentes dependiendo de las especies. Así, en el encéfalo de trucha arcoiris (2) y lubina (3) no se han hallado diferencias en los receptores de MEL entre medio día y media noche. En cambio, y coincidiendo con lo observado en la tenca, el lucio (4), el carpín (5) y el salmon masu (6) muestran variaciones diarias significativas en la capacidad de unión. Una posible justificación a esta diferencia podría basarse en que en muchos casos el estudio de los receptores se realiza en el encéfalo completo y no en regiones encefálicas concretas, lo que podría estar ocultando variaciones rítmicas en regiones discretas. El perfil rítmico diario observado en la tenca, con densidades superiores durante la fase luminosa del fotociclo coincide con el descrito en el cerebro de otros teleósteos (5, 6), sugiriéndose una posible regulación negativa de la indolamina sobre sus propios receptores. En nuestro estudio las variaciones diarias en la densidad de receptores observadas en la retina, el techo óptico y el corazón de la tenca no van acompañadas de cambios en la afinidad de los receptores. Esta

situación también se produce en la mayoría de las especies investigadas, salvo excepciones en las que ambos parámetros fluctúan diariamente. La conservación de este parámetro tiene un gran interés desde el punto de vista fisiológico, al ser indicativo de la sensibilidad del tejido diana frente a la hormona. En receptores funcionales, la afinidad por el ligando endógeno ha de coincidir con el intervalo fisiológico de éste, como de hecho sucede en la retina de la tenca.

El perfil estacional de densidad de receptores de MEL en la retina y el techo óptico de la tenca es similar al descrito en el cerebro de mamíferos, no existiendo estudios previos realizados en peces. No obstante, nuestros resultados revelan al techo óptico como área encefálica clave para la transducción estacional de la señal melatoninérgica en los peces, como se ha sugerido para otros poiquilotermos (1). Por otro lado, la existencia de cambios estacionales en los receptores de MEL en el corazón de la tenca, así como la notable termosensibilidad de los mismos, nos permite sugerir un posible papel de esta indolamina en la regulación estacional del sistema cardiovascular en los peces.

Finalmente los resultados obtenidos acerca del efecto de la temperatura sugieren que la temperatura es un factor ambiental clave en la regulación de la transducción de la señal melatoninérgica, al menos en poiquilotermos. Además, la cinética observada en el riñón podría indicar que el radioligando se esté uniendo a una proteína con carácter enzimático, no tratándose por tanto de un verdadero receptor.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el MCYT (AGL2001-0543-C03-03) y MEC (AGL2004-08137-C04-01). Los autores agradecen de forma especial al Centro Nacional de Ciprinicultura "Vegas del Guadiana" (Badajoz) la donación desinteresada de las tencas utilizadas en el presente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Isorna E, Guijarro A, Delgado MJ, Alonso-Bedate M, Alonso-Gómez AL 2004 Characterization of melatonin binding sites in the brain and retina of the frog Rana perezi. Gen comp Endocrinol 135:259-267
- Davies B, Hannah LT, Randall CF, Bromage N, Williams LM 1994 Central melatonin binding sites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen Comp Endocrinol 96:19-26
- Bayarri MJ, Iigo M, Muñoz-Cueto JA, Isorna E, Delgado MJ, Madrid JA, Sánchez-Vázquez FJ, Alonso-Gómez AL 2004 Binding characteristics and daily rhythms of melatonin receptors are distinct in the retina and the brain areas of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Brain Res 21:241-250
- 4. Gaildrat P, Ron B, Falcón J 1998 Daily and circadian variations of 2-[¹²⁵l]-lodomelatonin binding sites in the pike brain (*Esox lucius*) *J. Neuroendocrinol.* 10:511-517
- 5. ligo M, Furukawa K, Tabada M, Aida K 2003 Circadian variatios of melatonin binding sites in goldfish brain. *Neurosci Lett* 347:49-52
- 6. Amano M, Iigo M, Ikuta K, Kitamura S, Yamamori K 2003 Daily variations in melatonin binding sites in the masu salmon brain. *Neurosci Lett* 350:9-12

MOLECULAR, HISTOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL CHANGES IN SKIN OF HALIBUT DURING METAMORPHOSIS

M.A. Campinho^{1,2}, N. Silva¹, G.E. Sweeney² and D.M. Power¹

¹CCMAR, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal; ²School of Biosciences, Cardiff University, Museum Avenue CF10 3US Cardiff, UK.

ABSTRACT. During halibut metamorphosis skin undergoes dramatic changes from a simple 2-cell layer epithelia to a highly stratified tissue. These changes are not solely observed at the histological level but also at the molecular level. Here we report that an epidermal type I keratin gene from halibut is solely expressed in skin before metamorphosis, specifically in larval inner epidermal cells.

INTRODUCTION

Skin is the organ that constitutes the barrier between the animal body and its environment. In anurans at metamorphosis skin undergoes dramatic changes and superficial epidermal cells and inner epidermal basal larval skein cells constitute the simple pre-metamorphic skin. As metamorphosis progresses the skin undergoes cellular stratification of both the epidermis and dermis and the basal larval skein cells become adult basal cells that are responsible for the adult epidermal cell population (1). A number of molecular changes accompany the cellular and histological changes in skin and a notable change occurs in expression of members of the keratin gene family and some genes are repressed while others are activated (1). Keratins are the most abundant structural protein in epithelial tissues and are responsible for the maintenance of cell integrity and resistance to mechanical stress. All keratins are members of a family of cytoplasmatic intermediate filaments and are divided into acidic type I and basic type II. Keratins are present as filaments in cells and form a functional heterodimer of type I and type II keratin proteins.

In common with anurans, flatfish metamorphosis is controlled by thyroid hormones (2) and is accompanied not only by evident changes in phenotype but also by molecular, histological and morphological changes in a number of different tissues and organs. The skin undergoes a number of alterations during the course of flatfish metamorphosis and changes from a thin epithelia in the larvae to a much thicker and differentiated structure composed of several organised layers in the juvenile. The histological modifications that occur in skin during flatfish metamorphosis have been described in several species of fish but relatively little is known about the molecular changes that accompany this process and the possible involvement of thyroid hormones. The present study aimed to describe the histological and molecular changes that occur in Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus) skin during metamorphosis and relate this to changes in thyroid hormone levels.

MATERIAL AND METHODS

A cDNA library of metamorphosing halibut larvae was screened using a *Sparus auratus* keratin II DNA probe labelled with ^[32]PdCTP. Positive clones were isolated and sequenced. tBLASTx analysis was used identify gene

homology. ProDomain and STRING analysis was used to determine structural motifs and protein family.

Five halibut larvae per stage from pre-metamorphic stages to post-metamorphic juveniles were anesthetized and collected into RNAlater (Sigma-Aldrich) reagent, as was adult halibut skin, accordingly to the manufacturers instructions. Total RNA was extracted from each sample collected using Trizma (Sigma-Aldrich) reagent following the manufacturers instructions. Pools of total RNA were prepared using five individuals per stage and 3µg was fractionated on a 1.5% agarose/formaldehyde gel. RNA was then transferred to nylon membranes and cross-linked by exposure to UV light. The membranes were hybridised overnight with a 3'UTR [32]PdCTP-labelled probe of cDNA hKer1 and washed at high stringency. Membranes were exposed for 48 hours at -80°C to a BioMax film (Kodak). Animals were fixed in 4%PFA, 5µm transverse sections were cut and used for histological analysis. *In situ* hybridization was performed using a DIG-labelled RNA probe identical to the one used in the northern blot.

RESULTS

From the cDNA library screening a single full-length clone of 1550 nucleotide (nt) was isolated that encodes a protein of 446 amino acids (aa). The clone, hKer1, was designated as a putative type I keratin on the basis of sequence similarity after tBLASTx analysis. ProDomain and STRING analysis confirmed the tBLASTx results and indicated that hKer1 predicted protein has all the characteristics of an epidermal type I keratin. hKer1 is composed of a hypervariable C-terminal head region and N-terminal tail region which flanks a central highly conserved region (Fig. 1). The central region of hKer1 is composed of a number of highly conserved coil motifs, here designated as coil 1A and B and coil 2. The conservation of these motifs is characteristic of all keratins and is a consequence of their functional importance, they are involved in heterodimerization and assembly of type I keratin and type II keratin, which constitute the basic unit of keratin filaments.

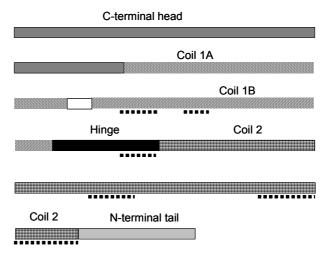


Figure 1. ProDomain analysis revealed that hKer1 presents all the characteristic type I keratin structural domains and STRING analysis (small squares) identifies all the 5 motifs only present in epidermal type I keratins thus confirming hKer1 molecular identity.

Northern blot analysis revealed that hKer1 gene is highly expressed in premetamorphic larvae and is undetectable in adult halibut skin.

Halibut larval skin starts to stratify in pre-metamorphic larvae (stage 7) and the first suprabasal epidermal cells arise. In post-metamorphic juveniles the skin is completely matured and identical to the adult skin, with a well-stratified epidermis and dermis. *In situ* hybridization analysis of transverse paraffin sections of the larvae at different stages of metamorphosis revealed that in pre-metamorphic larvae hKer1 is strongly expressed in larval inner epidermal cells. However, in adult halibut skin hKer1 is undetectable. The downregulation in expression of hKer1 is accompanied by changes in skin histology and coincides with the peak of thyroid hormones (THs) encountered in metamorphosing halibut larvae.

DISCUSSION

The isolated clone hKer1 from the cDNA library of metamorphosing halibut larvae is a representative of a halibut epidermal specific type I keratin gene. Northern blot and *in situ* hybridization analysis showed that hKer1 is a larval specific gene that is not expressed in juvenile animals or adult skin.

As previously reported (3), during halibut metamorphosis skin undergoes a dramatic change from a simple epithelia to an highly stratified tissue. The level of hKer1 expression appears to be negatively correlated with metamorphosis and its change in expression can be associated with histological and morphological changes in the skin. Interestingly, the spatio-temporal expression pattern of hKer1 observed in metamorphosing halibut resembles that reported for keratin genes during anuran metamorphosis (1). These observations may suggest that this mechanism of skin development and keratin expression was already present in the common ancestor of teleosts and terrestrial vertebrates. Although the down-regulation of hKer1 expression was coincident with the peak of THs that accompanies the progression of metamorphosis in halibut, it remains to be established if hKer1 gene is directly responsive to THs.

Acknowledgments

This work was funded by European Union project CT 96-1442, ARRDE-Q5Rs-2002-01192 and Portuguese Ministry of Science and Technology – Pluriannual funding to CCMAR. MA Campinho is funded by Portuguese Ministry of Science and Technology (SFRH/BD/6133/2001). We thank Fiskey (Iceland) for providing the animals samples and Heiddis Smáradóttir for their collection.

REFERENCES

- 1. Suzuki K-i, Utoh R, Kotani K, Obara M, Yoshizato K 2002 Lineage of anuran epidermal basal cells and their differentiation potential in relation to metamorphic skin remodeling. *Dev Growth Differ* 44:225-238
- 2. Miwa S, Inui Y 1987 Effects of Various Doses of Thyroxine and Triiodothyronine on the Metamorphosis of Flounder (Paralichthys-Olivaceus). *General and Comparative Endocrinology* 67:356-363
- Ottensen OH, Olafsen JA 1997 Ontogenetic development and composition of the mucous cells and the occurrence of saccular cells in the epidermis of atlantic halibut. *Journal of Fish Biology* 50:620-633

EFECTOS OSMORREGULADORES DE LA TESTOSTERONA EN EL TELEÓSTEO EURIHALINO Sparus auratus

F.J. Arjona¹; S. Sangiao-Alvarellos²; S. Polakof²; A. García-López³; M.P. Martín del Río¹; G. Martínez-Rodríguez³; J.L. Soengas² y J.M. Mancera¹

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales Universidad de Cádiz, 11510 Puerto Real, Cádiz ²Laboratorio de Fisioloxía Animal, Facultade de Ciencias do Mar, Universidade de Vigo, E-36310 Vigo ³Instituto Ciencias Marinas Andalucía, CSIC, 11510 Puerto Real, Cádiz.

RESUMEN. El sistema osmorregulador en la dorada (*Sparus auratus* L.) está controlado por múltiples sistemas hormonales. En este estudio, se determinaron los efectos del tratamiento con testosterona sobre la capacidad hipo- e hiperosmorreguladora en ejemplares inmaduros de *S. auratus* con el objetivo de obtener información sobre la influencia de los andrógenos en el sistema osmorregulador.

INTRODUCCIÓN

Los andrógenos más importantes en peces teleósteos son la testosterona (T) y su derivado la 11-cetotestosterona. Estas hormonas desempeñan funciones relacionadas con procesos sexuales: espermatogénesis, espermiación, maduración gonadal y desarrollo de los caracteres sexuales secundarios; y otras relacionadas con el crecimiento, digestión y utilización alimentaria, transporte intestinal y cambios en la composición del cuerpo. En el caso de la osmorregulación, estudios previos demuestran que la maduración sexual o el tratamiento con esteroides sexuales exógenos perjudica la capacidad de salmónidos para adaptarse a agua de mar (1). En especies no salmónidas, el tratamiento con 17β-estradiol tuvo efectos negativos sobre la actividad Na⁺,K⁺-ATPásica branquial en Oreochromis mossambicus (2) y Fundulus heteroclitus (3). Sin embargo, en el caso de la dorada se ha demostrado un efecto estimulador de esta hormona sobre la actividad Na⁺,K⁺-ATPásica branquial a largo plazo (4). Según nuestra información no existen estudios sobre el papel osmorregulador de la T en S. auratus. Así pues, el objetivo de nuestro estudio es determinar posibles efectos del tratamiento con T sobre la capacidad de adaptación a ambientes de baja y alta salinidad en ejemplares inmaduros de S. auratus.

METODOLOGÍA

Experimento 1: Ejemplares inmaduros de *S. auratus* adaptados a agua de mar (AM) (81,1 g \pm 1,6 de peso) fueron inyectados con aceite de coco solo (5 μ l/g de peso) o conteniendo T (2 o 5 μ g/g de peso). A los días 1, 3 y 7 postimplante, los animales (n=9 por grupo y tiempo) fueron sacrificados y muestreados. Antes de la inyección, un grupo de animales (n=9) fue sacrificado y muestreado y sirvió como grupo control a tiempo 0.

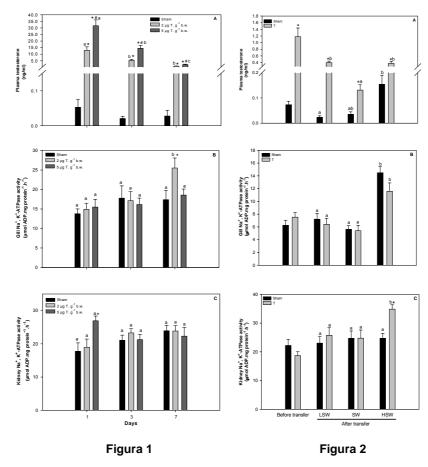
Experimento 2: Ejemplares inmaduros de S. auratus adaptados a AM (137,2 g ± 2,9 de peso corporal) fueron inyectados con aceite de coco solo (5 μl/g de peso) o conteniendo T (5 μg/g de peso). 5 días después del implante, 8 animales del grupo inyectado con aceite de coco solo y 8 animales del grupo inyectado con T fueron sacrificados y muestreados. El mismo día, 8 animales de cada grupo fueron transferidos a un ambiente de baja salinidad (6 ‰; test hipoosmótico; ABS), a agua de mar (SW), y a un ambiente de alta salinidad

(55 p.p.t.; test hiperosmótico; AHS). 9 días después de la transferencia (14 días post-implante) todos los grupos fueron muestreados. Los animales no inyectados fueron también sacrificados y muestreados. En los muestreos se tomaron biopsias branquiales y renales para la medición de la actividad Na⁺,K⁺-ATPásica y muestras de plasma para la medición de la osmolalidad y concentración de: T, glucosa, lactato, triglicéridos y proteínas totales solubles.

RESULTADOS

Experimento 1: No se observaron diferencias entre los peces no inyectados (tiempo 0) y aquellos inyectados con aceite de coco solo para ninguno de los parámetros analizados. El grupo control mantuvo una concentración de T constante a lo largo del experimento, mientras en los grupos tratados con T, los niveles de esta hormona aumentaron linealmente con respecto a la dosis de testosterona implantada (Fig. 1A). La actividad Na⁺,K⁺-ATPásica branquial solo se incrementó a los 7 días de tratamiento en el grupo inyectado con la dosis menor de T (Fig. 1B). La actividad Na⁺,K⁺-ATPásica renal aumentó en el primer día post-implante en el grupo tratado con la dosis mayor de T, disminuyendo al tercer día para equipararse a los niveles de los otros dos grupos (Fig. 1C). La osmolalidad no varió a lo largo del experimento ni tampoco debido al tratamiento (datos no mostrados). La concentración plasmática de glucosa, lactato y proteínas totales solubles aumentó a lo largo del tiempo pero solamente se detectaron diferencias significativas respecto al tratamiento en el caso de proteínas para el grupo inyectado con la dosis mayor de T en el día 7 (datos no mostrados). Los niveles de triglicéridos aumentaron en los grupos inyectados con T los primeros días aunque posteriormente desaparecieron estas diferencias.

Experimento 2: Los grupos tratados con T presentaron a los 5 días postimplante (antes de la transferencia) y a los 9 días post-transferencia (14 días post-implante) niveles hormonales mucho mayores que los grupos con aceite de coco para todas las condiciones experimentales (Fig. 2A). En los grupos inyectados con aceite de coco, los niveles de T aumentaron con la salinidad pero solamente hubo diferencias significativas entre los grupos transferidos a salinidades extremas (Fig. 2A). En los grupos inyectados con T, los valores de esta hormona permanecieron más altos en las salinidades extremas que en el grupo transferido a AM (Fig. 2A). La actividad Na⁺,K⁺-ATPásica branquial presentó un aumento significativo en los grupos transferidos a AHS respecto a los grupos transferidos a AM o ABS (Fig. 2B). La actividad Na⁺,K⁺-ATPásica renal aumentó significativamente en el grupo inyectado con T y transferido a AHS (Fig. 2C). La osmolalidad plasmática presentó diferencias significativas dependiendo de la salinidad, alcanzándose los mayores valores en los animales transferidos a AHS respecto a los animales en AM y ABS para ambos tipos de tratamiento (aceite de coco solo y con T) (datos no mostrados). Los niveles de glucosa incrementaron en los grupos transferidos a salinidades extremas, mientras que el tratamiento con T no produjo efecto significativo (datos no mostrados). La concentración de lactato aumentó significativamente en el grupo transferido a AHS y tratado con T con respecto al inyectado con aceite de coco solo (datos no mostrados). Los niveles de triglicéridos disminuyeron en los grupos aclimatados a salinidades extremas e inyectados con aceite de coco solo, aunque las diferencias no fueron significativas, mientras que el tratamiento con T no produjo ningún efecto (datos no mostrados). La concentración de proteínas solubles no presentó ninguna variación ni con respecto a la salinidad ni con respecto al tratamiento hormonal (datos no mostrados).



Figuras 1 y 2. Los valores son la media ± S.E.M. Las diferencias entre grupos se establecieron con ANOVA de dos factores y las comparaciones entre grupos mediante test de Tukey (P<0,05)(n=9, Exp. 1; n=8, Exp. 2). Las letras indican diferencias respecto al tiempo (Fig.1) y respecto a la salinidad (Fig.2). Los símbolos indican diferencias debido al tratamiento.

DISCUSIÓN

La T podría mejorar la capacidad hipoosmorreguladora de ejemplares inmaduros de *S. auratus*. Esta hipótesis está basada en: i) el incremento de la actividad Na⁺,K⁺-ATPásica branquial en ejemplares aclimatados a AM al día 7 e inyectados con una dosis de 2 μg/g de peso (Exp. 1); y ii) el incremento de la actividad Na⁺,K⁺-ATPásica renal en ejemplares transferidos a AHS e inyectados con T a una dosis de 5 μg/g de peso (Exp. 2). Sin embargo, en el primer caso, la actividad Na⁺,K⁺-ATPásica branquial no varía cuando se emplea una dosis mayor (5 μg/g de peso). Esta situación podría indicar una saturación de la respuesta de este transportador iónico ante el tratamiento hormonal o una inhibición de los posibles receptores branquiales para T como ha sido sugerido previamente para la respuesta de la actividad Na⁺,K⁺-

ATPásica branquial al tratamiento con 17β-estradiol (4). En el Exp. 2 tampoco se observa efecto osmorregulador en branquias a esta misma dosis hormonal, lo cuál confirma los resultados del Exp. 1. Por otro lado, en el Exp. 2 la actividad Na $^{+}$,K $^{+}$ -ATPásica renal sólo aumenta en los ejemplares tratados con T y aclimatados a AHS, mientras que en los Exps. 1 y 2 no se observa un incremento similar en animales inyectados con esta dosis en AM. Esta situación puede indicar una posible interacción de los sistemas hormonales activados con la transferencia a AHS y la T, ya que en el caso de ejemplares transferidos a AM no se observa ningún incremento de la actividad Na $^{+}$,K $^{+}$ -ATPásica renal.

La T no afecta, bajo nuestro diseño experimental, los diferentes parámetros metabólicos analizados. Sin embargo, en el caso del lactato, se observó un aumento significativo en ejemplares transferidos a AHS e inyectados con T. (Exp. 2). Para los otros parámetros, se observaron solamente tendencias al incremento de los niveles plasmáticos en ejemplares tratados con T pero que no fueron estadísticamente significativos. De este modo, no se pueden establecer conclusiones claras acerca de una posible movilización de estos metabolitos plasmáticos por la T para su utilización en los distintos tejidos. Por ello es necesaria la evaluación de los niveles de metabolitos y actividades enzimáticas en distintos tejidos para elucidar un posible papel metabólico de la testosterona en la dorada.

BIBLIOGRAFÍA

- McCormick SD and Naiman RJ 1985 Hypoosmoregulation in an anadromous teleost: influence of sex and maduration. J. Exp. Zool. 234: 193-198
- 2. Vijayan MM, Takemura A and Mommsen TP 2001 Estradiol impairs hypoosmoregulatory capacity in the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Am. J. Physiol*. 281: R1161-R1168
- 3. Mancera JM, Smolenaars M, Laiz-Carrión R, Martín del Río MP, Wendelaar Bonga SE and Flik G 2004 17β-estradiol affects osmoregulation in *Fundulus heteroclitus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 139B: 183-191
- Guzmán JM, Sangiao-Alvarellos S, Laiz-Carrión R, Míguez JM, Martin del Río MP, Soengas JL and Mancera JM 2004 Osmoregulatory action of 17βestradiol in the gilthead sea bream *Sparus auratus*. *J. Exp. Zool*. 301A: 828-836

EXPRESSION PATTERNS OF THE MAIN MLC ISOFORMS DURING HALIBUT (Hippoglossus hippoglossus L.) METAMORPHOSIS

N. Silva, V.M. Baptista and D.M. Power

Comparative and Molecular Endocrinology Group, CCMAR, Universidade do Algarve, Faro 8005-139, Portugal.

ABSTRACT. In developing fish larvae the axial musculature is the largest and most rapidly growing tissue and the transition from larval to adult muscle fibre types occurs gradually. In the present study the spatial and temporal expression of myosin light chains 1 (MLC1), 2 (MLC2) and 3 (MLC3) was studied in metamorphosing halibut by in situ hybridization and related to changes in whole body thyroid hormone concentrations. Halibut MLC expression was restricted to white muscle and no expression was observed in the superficial red muscle layer in the larval stages examined. In first feeding larvae the expression of MLC1, MLC2A and MLC3 exhibited a similar pattern and was confined to the muscle fibres of the germinal zones. The expression levels reached a maximum in larvae starting metamorphosis and transcripts were highly expressed throughout the epaxial and hypaxial musculature, this change coincided with a significant increase in the concentration of thyroid hormones. By the time larvae reached the metamorphic climax, MLC1 and MLC3 expression was still high throughout the musculature but expression of MLC2A was confined to small cells located adjacent to the myosepta.

INTRODUCTION

The importance of the thyroid hormones (THs); thyroxin (T_4) and triiodothyronine (T_3), in vertebrate development is well established (3) . In fish, THs are also involved in the transition of larvae to juveniles, the most dramatic manifestation of which is flatfish metamorphosis. TH treatment stimulates flatfish metamorphosis and the transformation from larvae to juvenile of a variety of teleost species (1, 4) . In the developing larvae the axial musculature is the largest and most rapidly growing tissue and the transition from larval to adult muscle fibre types occurs gradually and THs have been associated with the developmental transition of myosin isoforms (2). The functional unit of myosin in vertebrate adult fast skeletal muscle is composed of two heavy chains and four associated light chains, two regulatory (MLC2) and two alkali (MLC1 and MLC3) (5). In the present study, the ontogeny and distribution of regulatory and alkali light chain myosin was studied in relation to TH concentration and thyroid histology.

MATERIAL AND METHODS

The Atlantic halibut larvae, used in this study, were raised at Fiskey, Iceland. Larval rearing was carried out using standard commercial production routines. The larvae were reared at 10-11 °C, under constant light conditions (24L) and fed live artemia. Larvae were sampled with a dip-net at regular intervals from the age of 260 D° through to the end of metamorphosis 800°D.

The T_4 and T_3 content of whole larvae were assessed by radioimmunoassay (RIA) of larval extracts. Frozen larvae were extracted in methanol, reextracted in 50µl methanol, 200µl chloroform and 100µl barbital buffer, centrifuged (3,000 rpm for 30 min at 4° C). Then, the upper phase removed, lyophilized, reconstituted in assay buffer and assayed. Assays for both T_3 and T_4 were

performed using a double-antibody method under equilibrium conditions. Free hormone was separated from the bound hormone using precipitation with a second antibody. Larvae for histology and in situ hybridization were fixed in PFA (4%) overnight at 4°C and decalcified in EDTA pH 8 when necessary. Larvae were embedded in paraffin and serial transverse and sagittal sections of 5µm were mounted on glass slides coated with APES (Sigma-Aldrich) for in situ hybridization. In order to study thyroid gland development, sectioned larvae were stained using Cleveland-Wolfe trichrome and permanent preparations prepared by mounting in DPX. Digoxygenin-labelled riboprobes for MLC1, MLC2A and MLC3 were prepared by in vitro transcription of plasmid DNA containing PCR fragments encoding halibut MLC1, MLC2A and MLC3. DNA was purified, linearized with the appropriate restriction enzyme. Riboprobe synthesis was carried out using linearized DNA, 20U of the appropriate RNA Polymerase in transcription buffer (Promega, Madison, WI, USA) with 1µl of Digoxygenin-RNA labeling mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Sections were pre-hybridized at 58°C for 2 h in hybridization solution (50% formamide, 4xSSC, 0.1% torula RNA, 0.01% Heparin, 1x Denhart's, 0.1% Tween 20, 0.04% CHAPS). Hybridization was carried out overnight in the same solution containing riboprobe (2 μ g μ l⁻¹) at 58°C. To remove non-specifically bound probe, high stringency washes were carried out. Detection of hybridized probe was carried out using antidigoxigenin-AP Fab fragments (1:600, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Colour detection was carried out using the chromagens NBT and BCIP. Sections were analyzed using a microscope (Olympus BH2) coupled to a digital camera (Olympus DP11). Control experiments were performed by treating samples with RNase prior to hybridization with the riboprobe and/or by omitting riboprobe from the reaction.

RESULTS

Histological studies of the thyroid gland indicate that its activity appears to accompany the change in THs encountered during halibut development (fig. 1).

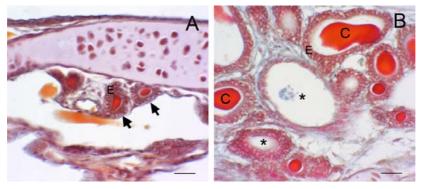


Figure 1. Cleveland-Wolfe trichrome staining on sagital sections of Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus) larvae showing the development of thyroid follicles (arrows). (A) first feeding (stage 5); (B) start of metamorphosis (stage 8); colloid c; epithelial cell layer, e; follicules lacking colloid, *. Scale bars indicate $20\mu m$.

In first feeding larvae the follicles are infrequent, small and are composed of a flattened unicellular epithelial cell layer surrounding a colloid-filled center. In halibut larvae following the yolk-sack period, vesicles are evident in the periphery of the colloid, and instances are found where the colloid is absent from follicles, suggesting increased thyroid activity. Furthermore, the number and size of thyroid follicles and their apparent activity continually increases until the start of metamorphosis, when follicles are numerous of a large diameter and frequently lack colloid, indicative of high thyroid activity. After the climax of metamorphosis thyroid follicles are still abundant but are less active. The variation in the concentration of T₃ and T₄ in halibut larvae accompanies the activity cycle of the thyroid follicles. Prior to metamorphosis T₄ (10 pg mg wet weight, n=6) and T3 (0.5pg mg $^{-1}$ wet weight, n=6) is fairly constant. The larval T₄ () and T₃ (2 pg mg $^{-1}$ wet tissue) content peaks at 610 D $^{\circ}$ just around the start of metamorphosis. After this, the T₄ and T₃ content of larvae declines. At first feeding MLC1, MLC2A and MLC3 were expressed and showed a similar pattern of distribution, with the hybridization signal being most intense at the periphery, of the dorsal and ventral areas where the germinal zones occur. The expression levels reached a maximum in white muscle at the beginning of metamorphosis and all three transcripts were highly expressed throughout the epaxial and hypaxial musculature. By the time larvae reached the metamorphic climax, MLC1, MLC2A and MLC3 expression was still high but expression was confined to fibres adjacent to the myosepts and to small cells scattered in the white muscle. MLC2A was also expressed in the red muscle fibres; provisional RT-PCR analysis revealed that no transition between larval and adult MLC isoforms occurs.

DISCUSSION

Associated with the radical change in the volume and organisation of axial muscle which occurs during fish larval development there is a shift in the distribution of myosin isoforms expressed. The ontogeny of thyroid tissue development and activity coincides with the change in muscle which accompanies metamorphosis. The present observations are consistent with the notion that the change in MLC gene expression may be driven by thyroid hormones. Further work will be required to establish if THs act directly or indirectly in changes in musculature during metamorphosis.

Acknowledgements

NS and VMB and work funded by EU project ARRDE (Q5RS-202-01192) and Pluriannual funding to CCMAR from the Portuguese Ministry of Science and Technology. We thank Heiddis Smáradóttir, (Fiskey, Iceland) for providing the animal samples.

REFERENCES

- de Jesus EGT, Toledo JD and Simpas MS (1998) Thyroid hormones promote early metamorphosis in grouper (Epinephelus coioides) larvae. Gen Comp Endocrinol 112(1): 10-16.
- Keikuze, Y, Takano-Ohmuro H, Obinata T, Inui Y (1994) Effect of Thyroid hormone on developmental transition of myosin light chains during flounder metamorphosis. Gen Comp Endocrinol 93: 321-326
- Power DM, Llewellyn L, Faustino M, Nowell MA, Bjornsson BT, Einarsdottir IE, Canario AVM and Sweeney GE (2001) Thyroid hormones in growth and development of fish. Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol 130(4): 447-459.

- 4. Solbakken JS, Norberg B, Watanabe K and Pittman K (1999) Thyroxine as a mediator of metamorphosis of Atlantic halibut, *Hippoglossus*
- hippoglossus. Environmental Biology of Fishes 56(1-2): 53-65.
 Thiébaud P, Rescan PY, Barillot W, Rallière C, Théze N (2001)
 Developmental program expression of myosin alkali light chain and skeletal
 genes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Biochimica et Biophysica Acta 1519:139-142.

CHRONIC CORTISOL ALTERS THE CENTRAL SEROTONERGIC SYSTEM IN THE RAINBOW TROUT (Oncorhynchus mykiss)

M. Mancebo, G. Rozas, J.J. Perez, M. Aldegunde

Laboratorio de Fisiología Animal (Instituto de Acuicultura) Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. España.

ABSTRACT. We have studied the effects of cortisol implants on 5-hydroxytryptamine (5-HT) and 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA) levels in three brain regions of the rainbow trout: hypothalamus, telencephalon and medulla oblongata. After 10 days of cortisol implant, levels of plasma cortisol were 8 times higher than those observed in controls. No effects were found neither in the 5-HT nor in 5-HIAA concentrations or in this ratio in the medulla oblongata of implanted animals even there was a tendency in decreasing concentrations of both molecules. In the hypothalamus, the implanted group showed a lower 5-HIAA concentration than the control group with no effect on the other stimated parameters. In the telencephalon, the serotonergic system was affected by cortisol, as showed by a significant decrease in serotonin concentration. In conclusion, elevated serum cortisol causes an inhibition in 5-HT synthesis and, we suggest that in trout the telencephalic and hypothalamic 5-HT systems are involved in the brain feedback loop for this hormone.

INTRODUCTION

The physiological effects of cortisol are well known in fish specially related to stress. In fish, steroids can interact with the CNS, and several hypothalamic paraventricular areas –which are serotonergic areas in teleosts- and also telencephalic areas are focus of these hormones. By other hand, it has been shown that serotonin acts as regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. (1,2,3,4,7)

In this work, we studied how cortisol affects serotonergic activity in three brain regions of the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): hypothalamus, telencephalon, and medulla oblongata.

MATERIAL AND METHODS

Rainbow trouts (220±7g) were kept for ten days in fiber glass tanks for acclimatization (pH 7.1-7.4, T^a 12-14 °C) and were fed once at day with commercial feed until 24 h before being sacrificed.

Cortisol implants: Fish were anesthetized with MS-222 and intraperitoneally injected with 1ml of warm (32°C) coconout oil containing 30 mg of cortisol/kg fish (implanted groups) or coconout oil alone (control groups).

Ten days after treatment, blood was collected via the caudal vein and plasma was stored at -80°C until hormone assay. Brains were removed and the three regions dissected according to Rozas at al. (5)

Plasma cortisol levels were determined using a cortisol clinical kit previously validated as described (6). Assays of 5HT and 5HIAA were performed by HPLC with electrochemical detection.

Statistical significance was calculated using Student-Newman-Keuls test.

RESULTS

Figure 1 shows an increase (p<0.05) in plasma cortisol levels (8x) after 10 days of cortisol implant respect to control group.

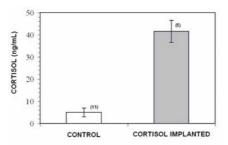


Figure 1. Changes in plasma cortisol levels.

As summarized in Table 1 no effects were found neither in the 5-HT nor in 5-HIAA concentrations or in its ratio in the medulla oblongata of implanted animals. In the hypothalamus, the implanted group showed a lower 5-HIAA concentration than in the control group with no effects on the other estimated parameters.

Table 1. Serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) levels and its ratio in hypothalamus and medulla oblongata of rainbow trout

	Group	5-HT (μg/g tissue)	5-HIAA (μg/g tissue)	5HIAA/5HT
	Control	0.59± 0.07 (9)	0.275± 0.02 (9)	0.46± 0.08 (9)
Hypothalamus	Cortisol Implanted	0.46± 0.04 (4)	0.199± 0.02 (4)*	0.43± 0.07 (4)
Medulla	Control	0.091± 0.008 (11)	0.115± 0.01 (11)	1.26± 0.10 (11)
Oblongata	Cortisol Implanted	0.072± 0.006 (4)	0.089± 0.01 (4)	1.23± 0.13 (4)
Values are mean \pm SEM (n). (*) different from control at level p < 0.05				

Figures 2 (A,B) and 3 show the effect of cortisol implants in telencephalic 5-HT metabolism. The serotonergic system was affected by cortisol, as showed by a decrease in serotonin concentration and a significant increase in the 5-HIAA/5-HT ratio (p<0.05).

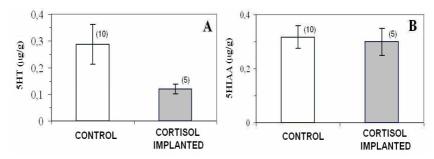


Figure 2. (A,B) Effects of cortisol implants on 5-HT (A) and 5-HIAA (B) levels.

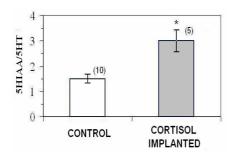


Figure 3. Effects of cortisol implants on 5-HIAA/5-HT ratio.

DISCUSSION

In this study, chronic elevated plasma cortisol levels cause a decrease in thelencephalic 5-HT syntesis, but do not affect hypothalamic 5-HT metabolism. It is known that 5-HT is involved in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA), estimulating or inhibiting this neuroendocrine axis (2,4). The results obtained in this work suggest that chronic cortisol may lower telencephalic 5-HT function. Thus, the thelencephalic 5-HT system can be considered, besides the hypothalmus, to be an integration and outflow area to control the HPA axis. We suggest that, as in mammals, the brain feedback loop for the cortisol is placed mainly in the telencephalic area.

Acknowledgments

This study was supported by Xunta de Galicia research Grant (PGIDIT03PXIB20001PR) to M. Aldegunde.

REFERENCES

- Wendelaar Bonga SE 1997 The stress response in fish. Physiol Rev 77:591-625.
- 2. Winberg S, Nilsson A, Hylland P, Soderstorm V, Nilsson GE 1997 Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitary-interrenal activity in teleost fish. Neurosci Lett 230:113-116.
- 3. Höglund E, Kolm N, Winberg S 2001 Stress-induced changes in brain serotonergic activity, plasma cortisol and aggressive behavior in arctic charr is counteracted by L-DOPA. Physiol Behav 74:381-389.
- Höglund E, Balm PHM, Winberg S 2002 Stimulatory and inhibitory effects of 5HT1A receptors on adrenocorticotropic hormone and cortisol secretion in a teleost fish,the Artic charr (Salvelinus alpinus). Neurosci Lett 324:193-196
- 5. Rozas G, Rey P, Andrés MD, Rebolledo E, Aldegunde M 1990 Annual vartiations in brain serotonin and related compounds of domesticated rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish Physiol Biochem 8:501-506.
- Rey P, Rozas G, Alfonso M, Rebolledo E, Aldegunde M 1990 Utilización de un kit comercial de radioimnunoensayo para medir los niveles séricos de cortisol en la trucha arco iris (Oncorhynchus mykiss): niveles durante el período de esmoltificación. Actas III congreso Nac Acuicult 249-253.
- Lepage O, Tottmar, O, Winberg, S 2002 Elevated dietary intake of Ltrytophan counteracts the stress-induced elevation of plasma cortisol in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). J Exp Biol 205(23):3679-3687.

EFECTO DE LA VASOTOCINA SOBRE LA SÍNTESIS DE MELATONINA EN EL ORGANO PINEAL DE LA TRUCHA ARCOIRIS: POSIBLE IMPLICACIÓN DE RECEPTORES V1

A. Rodríguez-Illamola, M. Gesto, R.M. Ceinos, B. Fernández-Durán, J.L. Soengas, J.M. Míguez

Laboratorio de Fisiología Animal, Facultad de Biología, Universidad de Vigo.

RESUMEN. En este estudio se investigó el efecto de la arginina vasotocina (AVT), un péptido neurohipofisiario, sobre la producción de melatonina en órganos pineales de trucha mantenidas en cultivo. El experimento se realizó a distintas intensidades de luz (0, 10, 100, 600 lux) y se testó el efecto de diferentes concentraciones de AVT de 10⁻⁷ a 10⁻¹³ M sobre la síntesis y niveles de melatonina. En órganos pineales adaptados a condiciones de luz moderada (100 lux) la AVT estimuló la producción de melatonina. El efecto de la AVT fue menos importante a intensidades de luz más elevadas (600 lux) y no se manifiestó en condiciones de oscuridad o de intensidades de luz bajas (10 lux). Además, la acción de la AVT fue bloqueada mediante la aplicación de un antagonista específico de receptores V₁, lo cual sugiere la intervención de este tipo de receptores en su mecanismo de acción.

INTRODUCCIÓN

La melatonina regula múltiples procesos fisiológicos y de comportamiento en vertebrados (1). En los peces teleósteos, esta hormona se produce en el órgano pineal y la retina presentando un fuerte ritmo diario de síntesis y liberación con niveles bajos durante el día y altos durante la noche. A diferencia de otras especies de teleósteos, en la trucha arco iris es la luz que incide directamente sobre los fotorreceptores la que condiciona la producción diaria de melatonina pineal (1,2). Además, se ha sugerido que en la regulación de la actividad pineal en peces pueden participar diferentes hormonas, neurotransmisores y neuromoduladores (1), aunque existen escasos estudios al respecto.

La arginina-vasotocina (AVT) es un nonapéptido sintetizado y liberado desde las células neurosecretoras hipotalámicas que terminan a nivel neurohipófisario. La AVT juega un papel importante en el control de la osmorregulación y la actividad cardiovascular, así como en diversos procesos fisiológicos especialmente relacionados con cambios ambientales (3). En teleósteos, hay evidencias acerca de la existencia de ritmos diarios en los niveles circulantes de AVT (4) y de su posible relación con las variaciones diarias de melatonina (4). Estudios en mamíferos también han revelado una clara relación de la AVT y de la vasopresina (análogo estructural y funcional de la AVT de peces) con la síntesis de melatonina en la glándula pineal (5). Todo esto nos llevó a estudiar el posible papel de la AVT en la producción de melatonina en el órgano pineal de la trucha arco iris.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inmaduras obtenidas de una piscifactoría comercial (Noia, A Coruña) y trasladadas a nuestras instalaciones donde se mantuvieron en tanques con agua a 15° C. Los experimentos se realizaron cultivando los órganos pineales en una solución Hanks modificada (CaCl₂ 0,85 mM, MgSO₄ 0,55 mM, KCl 3,63 mM, KH₂PO₄

0,4 mM, NaCl 92,56 mM, Na₂HPO₄ 0,23 mM, glucosa 3,75 mM, HEPES 7,5mM, triptófano 0,95 μ M, glutamina 9,98 μ M), penicilina 50 Ul/ml y estreptomicina 50 Ul/ml, con pH de 7 y una temperatura estable de 15 °C. Se realizaron dos experimentos: en el primero se estudió el efecto de distintas dosis de AVT (10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} y 10^{-13} M) sobre la liberación de melatonina en distintas condiciones lumínicas: 10, 100 y a 600 lux. En el segundo experimento se verificó el efecto de AVT en presencia de un antagonista específico de receptores V1, el ß-mercapto-ß-ß-cyclopentametilenopropionil-O-me-tyr²Arg⁸Vasopresina, bajo condiciones lumínicas de 100 lux.

La actividad del enzima arylalquilamino-N-acetil transferasa (AANAT) y los niveles de melatonina y serotonina se realizaron por cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorimétrica. Para el análisis estadístico se utilizó un ANOVA de una vía y el test de Studen-Newman-Keuls (p<0.05).

RESULTADOS

El tratamiento con AVT durante tres horas en el cultivo no tuvo efectos en la secreción de melatonina en órganos pineales de trucha mantenidos en condiciones de oscuridad completa (0 lux), ni tampoco a intensidades bajas de luz (10 lux). No obstante, se encontraron efectos significativos estimulatorios y dosis dependientes de la AVT sobre la secreción de melatonina en condiciones de iluminación moderada y alta (100 y 600 lux).

Estos efectos fueron acompañados por un aumento de la actividad AANAT, enzima limitante de la síntesis de melatonina. También se encontró un descenso simultáneo de la secreción de serotonina.

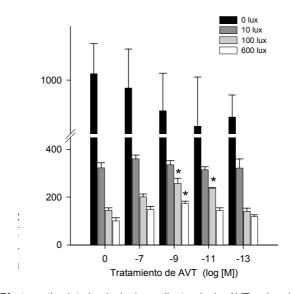


Figura 1. Efecto estimulatorio dosis-dependiente de la AVT sobre la secreción de melatonina a las 3 horas de aplicar el tratamiento bajo condiciones de 0, 10, 100 y 600 lux. No se observó efecto alguno a condiciones lumínicas de 0 y 10 lux. Medias \pm EEM. N = 6-8 pineales por grupo. *: P < 0,05 vs control.

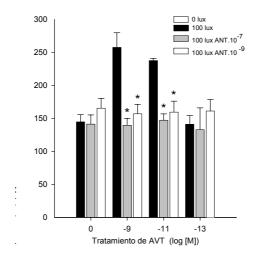


Figura 2. Acción bloqueante del antagonista de receptor V_1 sobre el efecto estimulatorio de la AVT en la producción de melatonina a 100 lux. Medias \pm EEM. N = 6-8 pineales por grupo. *: P < 0,05 vs grupo tratado con AVT sin antagonista.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que la AVT estimula la liberación de melatonina en condiciones de intensidad de luz moderada (100 lux), pero no en intensidades de luz baja ni en oscuridad completa. Este efecto podría estar relacionado con la existencia del pico circulante de AVT durante los primeros momentos de la noche (4), lo cual sugiere una relación fisiológica entre el péptido circulante y la síntesis de melatonina nocturna en el órgano pineal. Los datos indican que la AVT parece actuar a través de receptores específicos de tipo V1. Todo ello sugiere que la AVT interactúa con la inhibición lumínica de la síntesis de melatonina en el órgano pineal de la trucha.

Agradecimientos

Subvencionado por proyecto del MEC-FEDER (AGL2004-08137-C04-03/ACU).

BIBLIOGRAFÍA

- Ekström P, Meissl H 1997 The pineal organ of teleost fishes. Rev. Fish Fisheries 7:199-284
- Bégay V, Falcón J, Thibault C, Ravault, J-P, Collin, J-P 1992 J. Neuroendocrinol. 4: 337-345.
- 3. Balment R J, Warne J M, Tierney M, Hazon N 1993. Arginine vasotocin and fish osmorregulation. Fish Physiol. Biochem. 11:189:194
- Kulczykowska E 1999 Diel changes in plasma arginine vasotocin, isotocin, and melatonin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiol. Biochem. 21:141-146
- Stehle J, Reuss S, Riemann R, Seidel Vollrath, L 1991 The role of argininevasopressin for pineal melatonin synthesis in the rat: involvement of vasopressinergic receptors. Neurosci. Lett. 123:131-134

CLONING OF A THYROID STIMULATING HORMONE RECEPTOR FROM THE GONADS OF EUROPEAN SEA BASS,

Dicentrachus labrax

A. Rocha, A. Gómez, S. Zanuy and M. Carrillo

Fish Physiology and Biotechnology Department. Instituto de Acuicultura Torre de la Sal, CSIC. Spain.

ABSTRACT. A cDNA encoding a putative thyroid stimulating hormone receptor (sbsTSHR) was cloned from the testis of the sea bass (*Dicentrachus labrax*). The sbsTSHR showed the highest amino acid sequence identity with the TSHRs of other fish species. In addition to the testis, abundant sbs*tshr* expression was detected in brain & pituitary, heart and ventral kidney, whereas weaker expression was found in ovary and other tissues. Finally, a mRNA variant of this gene, with a shorter 3' UTR, was also found.

INTRODUCTION

The thyroid stimulating hormone (TSH) is a glycoprotein synthesized and secreted from thyrotrophs of the anterior pituitary gland. It acts by binding to and activating its specific receptor, the TSHR, belonging to the G-protein coupled receptor family (GPCR). Unlike mammals, the thyroid tissue in fish is not encapsulated into a singular gland. Rather, the thyroid follicles are diffusely dispersed within the connective tissue on the surface of the ventral aorta and other basibranchial areas (1). The thyroid hormones in these vertebrates not only regulate overall metabolism, but also modulate some specific physiological processes such as osmoregulation, migratory movements and larval metamorphosis. In addition to the referred functions, recent studies performed in different fish species, including the striped bass (2), salmon (3) and catfish (4), suggest a role of TSH directly on gonadal physiology.

In this work, we report for the first time, the cloning of a complete cDNA from the gonads of sea bass with structural characteristics of a TSHR (sbsTSHR). This cDNA was isolated while attempting to isolate the gonadal cDNAs encoding the sea bass gonadotropin receptors.

MATERIAL AND METHODS

A 1061 bp specific cDNA probe for the sea bass TSHR was obtained by RT-PCR using degenerate primers and then used to screen a cDNA testicular library. A phylogenetic analysis was done by the neighbor-joining method with full length protein sequences. One thousand bootstrapping pseudo replicates were used to assess the robustness of the inferred nodes. The expression of the sea bass TSHR mRNA in gonads and somatic tissues of adult fish was studied by RT-PCR using specific primers designed in the extracellular domain. The integrity and amount of RNA used in each reaction was verified by uniform amplification of the sea bass 18S rRNA transcript. Total RNA from sea bass testis was used for performing 3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE), using a gene-specific primer that annealed to a region of sbs*tshr* transmembrane domain.

RESULTS

Screening of a cDNA testicular library with a specific probe for the sbstshr rendered a clone containing a cDNA insert of 2069 bp. This clone was found to be a truncated form of the tshr gene, lacking the complete extracellular domain. Using a PCR based approach, where the cDNA testicular library was used as template, we obtained the remaining sequence. A 3586 bp fragment containing the complete coding sequence was generated by in frame ligation of the cDNA library insert and a RT-PCR product coding for the N-terminal region of the protein. The full-length sea bass tshr cDNA has an open reading frame of 2340 bp that codes for a 779 aa polipeptide, flanked by 5' and 3' untranslated regions of 227 and 999 nucleotides respectively. Seven transmembrane domains as well as the presence of a putative signal peptide could be predicted. Comparisons of this sequence with those contained in databases showed the highest similarities with other TSHR sequences, being the transmembrane domain the most conserved region and the extracellular domain the most divergent. Thus, this gene has been identified as the sea bass TSHR. Besides, phylogenetic analysis clearly demonstrates that the sbsTSHR belongs to the TSHR cluster.

Tissue expression analysis revealed that the sbstshr gene is highly expressed in testis and to a lesser level, in the ovary. This transcript could also be detected in several somatic tissues from which, brain & pituitary, heart and ventral kidney showed the strongest amplification signal. Finally, a mRNA variant of this gene was also found. This transcript has a shorter trailer sequence, originated by the use of an alternative polyadenilation signal, present 358 bp from the stop codon.

DISCUSSION

The described results confirm that we have cloned a sea bass tshr. This will allow to further explore the presumed role of TSH in the sea bass gamete physiology. With this work, we have also completed the isolation of the genes that together, form the GpHrs family of the sea bass.

Acknowledgements

Supported by a grant of the Spanish Ministry of Science and Technology (AGL2001-1257) to MC. The European Social Fund and Portuguese National funds under Portuguese National Science Foundation (FCT) POCI-2010 SFRH/BD/6901/2001 covered a fellowship received by AR.

REFERENCES

- 1. Gorbman A, 1969 in Fish Physiology (Hoar WS & Randall DJ Eds.) Vol. 2, pp. 241-274 Academic Press New York
- 2. Kumar RS, Ijiri S, Kight K, Swanson P, Dittman A, Alok D, Zohar Y, Trant JM 2000 Cloning and functional expression of a thyrotropin receptor from the gonads of a vertebrate (bony fish): potential thyroid-independent role for thyrotropin in reproduction. Mol Cell Endocrinol 167:1-9
- 3. Oba Y, Hirai T, Yoshiura Y, Kobayashi T, Nagahama Y 2000 Cloning, functional characterization, and expression of thyrotropin receptors in the thyroid of amago salmon (Oncorhynchus rhodurus). Biochem Biophys Res Commun 276:258-263
- 4. Vischer HF, Bogerd J 2003 Cloning and functional characterization of a testicular TSH receptor cDNA from the African catfish (Clarias gariepinus). Journal of Molecular Endocrinology 30:227-238

NEUROPEPTIDERGIC AND AMINERGIC SYSTEMS IN THE BRAIN AND PITUITARY OF THE MEAGRE, *Argyrosomus regius*

F. Confente, M.C. Rendón, M.L. González de Canales and J.A. Muñoz-Cueto

Department of Biology. Faculty of Marine and Environmental Sciences. University of Cádiz. Campus Rio San Pedro. E-11510 Puerto Real, Spain.

ABSTRACT. The distribution of the main neuroendocrine systems has been analyzed in the meagre, *Argyrosomus regius*. Three different gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) systems have been detected in this species: salmon GnRH-, seabream GnRH- and chicken GnRH II-immunoreactive (ir) cells. Among them, sbGnRH represents the hypophysiotrophic form, but sGnRH also reached the pituitary gland. Furthermore, other neuropeptidergic (neuropeptide Y, galanin) and aminergic cells have been detected in different brain areas involved in the control of reproductive and metabolic processes. Most of these neuroendocrine systems sent axons that reached the adenohyophysys of the meagre.

INTRODUCTION

The meagre, *Argyrosomus regius* is a characteristic teleost species of Atlantic and Mediterranean coasts. Currently much effort is being directed towards the intensive aquaculture of commercially novel species such as the meagre, but many problems are being encountered in reproductive performance and early development. At least in part, some of these problems could be the consequence of neuroendocrine disruptions under particular conditions of cultivation used. Unfortunately, in the meagre there is no published information on the form of action of those neuroendocrine factors that traditionally have been related to reproduction in fish (e.g. GnRH, catecholamines, neuropeptide Y, galanin, serotonin) nor on their distribution in the brain. In this work we examine the precise distribution of neuroendocrine systems potentially implicated in the regulation of reproduction and metabolism in this new species for marine aquaculture.

MATERIAL AND METHODS

Adult specimens of meagre (Argyrosomus regius) were captured in the Atlantic coast (Cádiz, Spain). Animals were deeply anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in phosphate buffer (PB; 0.1M, pH 7.4). The brains and pituitaries were excised and serial transverse sections were obtained with the help of a cryomicrotome. The sections were immunostained using streptavidin-biotin-peroxidase or immunofluorescence techniques. Sections were incubated with different primary antisera: anti-salmon gonadotrophin-releasing hormone associated peptide (GAP), anti-seabream GAP, anti-chicken-II GAP, anti-neuropeptide Y, anti-galanin, anti-tyrosine hydroxylase and anti-serotonin. Furthermore, pituitary sections were processed with antibodies against the different adenohypophyseal hormones (prolactin, ACTH, FSH, LH, GH, TSH, MSH and somatolactin). In streptavidinbiotin-peroxidase method, the sections were incubated with a biotinylated secondary anti-IgG sera and the streptavidin-peroxidase complex. Peroxidase activity was detected using 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), For immunofluorescence methods, secondary anti-IgG antibodies coupled to fluorescein (FITC) or Texas Red were used. The tissue sections were analyzed on a photomicroscope Olympus BH2 and computer images were obtained with an Olympus C5050 zoom Digital Camera (Japan).

RESULTS

Salmon preproGnRH (sGAP) immunoreactivity predominate in the rostral forebrain, mostly in the olfactory bulbs (OB) and the telencephalon, associated to the terminal nerve ganglion cells (TNgc) (Fig.1A). However, we could also observe sGAP-immunoreactive (-ir) cells in the preoptic area. The sGAP-ir fibers innervate profusely all the meagre brain. The pituitary gland only receives a small number of these fibers, that enter the neurohypophysis and reach the proximal pars distalis of the adenohypophysis.

Chicken-II preproGnRH (cIIGAP) system was constituted by a single cell group lying close to the fibers of the medial longitudinal fascicle, in the synencephalon (Fig.1B). In turn, cIIGAP fibers were profusely distributed in the brain of meagre, being especially evident in the midbrain and hindbrain, but also in forebrain areas. However, no cIIGAP fibers were detected in the hypophysis of the meagre.

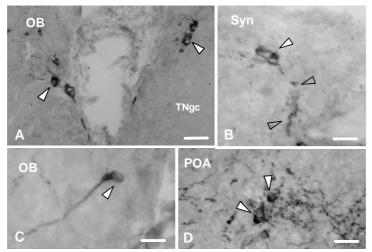


Figure 1. A: salmon preproGnRH fibers and cells (TNgc) present in the terminal nerve area at the caudal level of the olfactory bulbs (OB). B: large chicken-II preproGnRH cell in the dorsal synencephalon (Syn). C: seabream preproGnRH cell in the olfactory bulbs (OB). D: seabream preproGnRH cells and fibers in the preoptic area (POA). Scale bars = $50 \, \mu m$.

Seabream preproGnRH (sbGAP) cells of the meagre were abundant in the preoptic area (POA) (Fig.1D) but were also detected in ventral telencephalon and olfactory bulbs (OB) (Fig.1C). The sbGAP fibers were mainly observed along the ventral forebrain, running from the preoptic area to the hypothalamus and entering the meagre pituitary. These sbGAP neurosecretory terminals end in close proximity of FSH, LH and GH cells. Thus, as in other teleost, sbGnRH represents the main hypophysiotrophic GnRH isoform in the meagre.

Neuropeptide Y (NPY)-immunoreactive cells were localized in the ventral and dorsal telencephalon, caudal preoptic area (Fig. 2A), ventrocaudal hypothalamus, optic tectum, and synencephalon. NPY-ir fibers extend

profusely through the telencephalon, preoptic area and hypothalamus, but also reach the optic tectum and mesencephalic tegmentum.

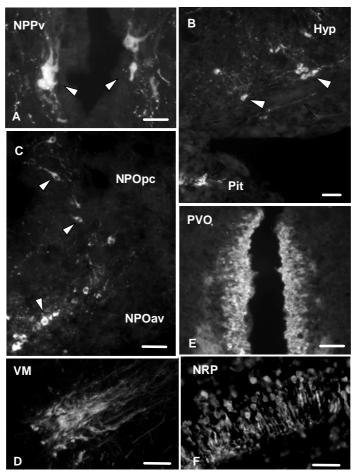


Figure 2. Peptidergic and aminergic systems in the brain of the meagre. A: NPY-ir cells and fibers in the caudal preoptic area (NPPv). B: GAL-ir cells in the ventral hypothalamus. Note the presence of GAL-ir fibers within the pituitary (Pit). C: TH-ir cells in the anteroventral (NPOav) and parvocellular (NPOpc) parts of the parvocellular preoptic nucleus. D: TH-ir cells and fibers in the ventromedial thalamic nucleus (VM). E, F: abundant periventricular serotoninergic cells were observed in the paraventricular organ (E) and the nucleus of the posterior recess (NRP).(F). Scale bars = 50 μm.

Galanin (GAL)-ir cells were located in the rostral preoptic area and periventricular hypothalamus (Fig. 2B). Galaninergic-ir fibers have a widespread distribution in the brain of the meagre and also reach the pituitary (Fig. 2B), suggesting an important role of this neuropeptide in neuroendocrine regulation of brain and adenohypophyseal functions in this species.

Tyrosine hydroxylase (TH) cells were identified in the olfactory bulbs, ventral telencephalon, preoptic area, ventral thalamus, caudoventral hypothalamus, periventricular pretectum, posterior tuberculum, synencephalon, isthmic region and rhombencephalon (Fig. 2C,D). The presence of TH-ir fibers in the brain of meagre is particularly evident within and around the nuclei in which immunoreactive cells are found, but also in the dorsal telencephalon, pretectum, optic tectum and tegmentum. TH-ir axons also enter the the pituitary stalk, reaching the proximal pars distalis of the adenohypophysis. Serotonin. The presence of cerebro-spinal fluid (CSF)-contacting serotonin-ir cells was observed in the paraventricular organ (Fig. 2E) and around the lateral and posterior recesses (Fig. 2F). We have also identified serotonin cells in the raphe and reticular formation. Serotonin-ir fibers have a wide distribution throughout the entire brain but no ir-fibers were detected in the pituitary.

DISCUSSION

This immunohistochemical study corroborated the presence of three GnRH isoforms in the brain of meagre, as it has been referred in other perciform species¹. Both sbGnRH and sGnRH fibers reached the pituitary of the meagre but sbGnRH innervation was much more profuse, in particular in proximity of FSH and LH cells, suggesting that sbGnRH represents the main hypophysiotrophic GnRH form. This is consistent with the presence of GnRH receptors identified in gonadotrophic cells of different teleost species^{2,3}.

The comparative distribution of other peptidergic and aminergic neural systems was also examined by immunofluorescence in the brain of the meagre. As in other teleosts^{4,5}, anatomically distinct forebrain neurosecretory systems overlapped mostly within the preoptic area and tuberal hypothalamus and send fiber projections to the neurohypophysis, suggesting their important hypophysiotrophic role. However, aminergic (catecholaminergic and serotoninergic) cells and fibers were also detected in the midbrain and/or hindbrain reinforcing the role of these systems in the control of sensory-motor functions.

Acknowledgments

Supported by UE IPE/IC-INTERREG III A-MARR/PR/2002-149 (OPAM).

REFERENCES

- González-Martínez D., Zmora N., Mañanos E., Saligaut D., Zanuy S., Zohar Y., Elizur A., Kah O., Muñoz-Cueto J.A. 2002. Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs in the brain and pituitary of the Europea Seabass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides. J Comp Neurol. 446: 95-113.
- González-Martínez D, Madigou T, Mañanos E, Cerda-Reverter JM, Zanuy S, Muñoz-Cueto JA. 2004. Cloning and expression of gonadotropinreleasing hormone receptor in the brain and pituitary of the European sea bass: an in situ hybridization study. Biol Reprod. 70(5):1380-91.
- 3. Lethimonier, C., Madigou, T., Muñoz-Cueto, J.A., Lareyre, J.-J., Kah, O. 2004. Evolutionary Aspects of GnRHs, GnRH Neuronal Systems and GnRH Receptors in Teleost FishGen. Comp. Endocrinol. 135: 1-16.
- 4. Batten TF, Cambre ML, Moons L, Vandesande F. 1990. Comparative distribution of neuropeptide-immunoreactive systems in the brain of the green molly, Poecilia latipinna. J Comp Neurol. 302: 893-919.
- Batten TF, Berry PA, Maqbool A, Moons L, Vandesande F. 1993. Immunolocalization of catecholamine enzymes, serotonin, dopamine and L-dopa in the brain of Dicentrarchus labrax (Teleostei). Brain Res Bull.31:233-252.

IDENTIFICATION OF POLYMORPHISMS IN ENDOCRINE RELATED TRANSCRIPTS IN THE SEA BREAM (Sparus auratus)

B.P. Louro and D.M. Power

Comparative and Molecular Endocrinology Group, CCMAR, Universidade do Algarve, Faro 8005-139, Portugal.

ABSTRACT. As a first step towards establishing if endocrine factors could be QTL more than five thousand Expressed Sequence Tags (ESTs) from several Gilthead sea bream cDNA libraries were screened for hypervariable genetic markers linked to endocrine factors. Microsatellites (type II markers) were found in 4% of all EST tags and over 9% of them were present in transcripts involved in endocrine processes. To establish if the microsatellites identified were polymorphic a panel of genomic DNA extracted from a wild population of sea was screened. Forty five percent of the microsatellites associated with genes were found to be polymorphic, suggesting the existence of diverse alleles and raising the possibility that they may give rise to different physiological responses between individuals. The development and implementation of such genetic markers linked to genes which have established physiological actions will allow their positioning in physical and linkage genomic maps of the sea bream and make it possible to test for associations between these candidate genes and traits of economic importance.

INTRODUCTION

The endocrine system regulates a number of important physiological processes such as reproduction, development, growth and ion balance in fish (reviewed in (1)). In spite of the importance of endocrine factors in production traits of aquaculture species relatively few attempts have been made to establish if they have a quantitative effect (quantitative trait loci, QTL) (2, 3). The present work, integrated in the European BridgeMap project (Q5RS-2001-01797), aims to develop endocrine related genetic markers to contribuite to radiation, linkage and comparative maps. The ultimate aim is to develop and implement breeding programs for this species using marker assisted selection.

MATERIAL AND METHODS

Approximately five thousand Expressed Sequence Tags (ESTs) from several Gilthead sea bream cDNA libraries were screened to identify endocrine factors and related genes and to identify those with a linked hypervariable genetic marker. The sequences were downloaded from public and the BridgeMap project database, clustered and identified using repectively blastcluster and blast-2.2.11-ia32-win32 blastall scripts from (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/executables/release/2.2.11/). Sequences containing microsatellites were identified using FPCR v.3.6.68 (http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/download.htm). Primers flanking the microsatellite loci in the endocrine related transcripts were designed with Primer3 vo.2 software (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3 www.cgi). In order to determine if the microsatellites identified were polymorphic a panel of genomic DNA (4) from a wild population of sea bream (from Morocco, France, Italy, Greece and Portugal) were used in PCR with specific primers. In brief PCR was carried out in a final reaction volume of 10µl containing 0.1 μ g of gDNA, 10mM Tris-HCl pH 9.0, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2mM MgCl₂, 40 μ M dNTP, 0.3pmol of forward primer, 0.3pmol of reverse primer and Taq DNA polymerase (1.25U; Eurotaq, Milano, Italy), sterile water substituted gDNA in control reactions. A uniform PCR cycle was used for all primers and consisted of: 2min at 94 $^{\circ}$ C followed by 35 cycles of 94 $^{\circ}$ C for 30s, 57 $^{\circ}$ C for 30s) and 72 $^{\circ}$ C for 30s. The presence or absence of polymorphic products was analysed on a 3 $^{\circ}$ metaphor agarose gel containing ethidium bromide (0.5 μ g/ μ l).

RESULTS

Microsatellites (type II markers) were found in 4% of all EST tags analysed (5,000) and over 9% of all microsatellites identified were linked to transcripts involved in endocrine processes. Forty five percent of the microsatellites associated with endocrine transcripts were found to be polymorphic and several different alleles were evident for each primer pair utilised (fig. 1). Variability between alleles found in the gDNA prepared from sea bream of different geographical locations was particulally pronounced.

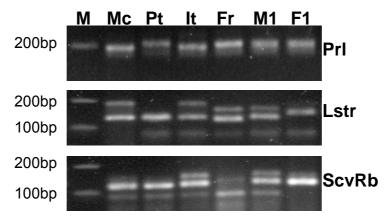


Figure 1. Examples of polymorphic loci linked to endocrine related genes. PCR reaction products amplified in the gDNA panel were run on 3% metaphor agarose gels in TBE. The samples of the gDNA panel were of sea bream from Mr- Morocco, Pt- Portugal, It-Italy, Fr- France, M1- Greece, F1- Greece. M- 1Kb+ marker. Prl- Prolactin, Lstr- Like mus musculus lung seven transmembrane receptor, ScvRb- Scavenger receptor class B, member 1

DISCUSSION AND CONCLUSION

Despite the relatively small number of gene analysed (5,000) the frequency with which microsatellites were encountered, 4%, was similar to that reported in other vertebrates (5). Moreover, 45% of the microsatellites associated with genes were found to be polymorphic and indicate the existence of diverse alleles. The presence of multiple alleles for a given gene raises the possibility that they could be responsible for differing physiological responses between individuals in a population (6). The development and implementation of such genetic markers will allow more accurate positioning of genes in both physical and linkage maps of the genome in sea bream and facilitate tests for association between genes and traits of economic importance. The developed

markers may also be useful as anchor markers for comparative mapping and evolutionary studies due to higher levels of transferability between species (7).

Acknowledgements

Financed by EU project BRIDGEMAP (Q5R-2001-01797) and Pluriannual funding to CCMAR from the Portuguese Ministry of Science and Technology.

REFERENCES

- 1. Bentley, P.J., 2002. Comparative Vertebrate Endocrinology. Cambridge University Press, Cambridge, 426 pp.
- 2. Tao WJ and Boulding EG (2003) Association between single nucleotide polymorphisms in candidate genes and growth rate in artic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Heredity* 91, 60-69
- 3. Liu Z (2003) A review of catfish genomics: progress and perspectives. *Comp. Func. Genomics* 4, 259-265
- 4. Laird, P. W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M.A., Jaenisch, R. and Berns, A. (1991). Simplified Mammalian DNA Isolation Procedure. Nucleic Acids Research 19, 4293.
- Bin Li, Qingyou Xia*, Cheng Lu*, Zeyang Zhou, and Zhonghuai Xiang (2004). Analysis on Frequency and Density of Microsatellites in Coding Sequences of Several Eukaryotic Genomes. Geno. Prot. Bioinfo. 2: 24-31
- 6. International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409: 860-921.
- 7. Rajeev K. Varshney, Andreas Graner and Mark E. Sorrells (2005) Genic microsatellite markers in plants: features and applications. Trends in Biotechnology 23: 48-5

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO (FSH) DE LUBINA (Dicentrarchus labrax)

G. Molés, A. Gómez, A. Rocha, M. Carrillo y S. Zanuy

Dpto. Fisiología y Biotecnología de Peces. Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, CSIC, 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, España.

RESUMEN. La hormona estimulante del folículo (FSH), secretada por la glándula hipofisaria, es una de las hormonas clave en el control de la reproducción de vertebrados. El presente trabajo describe la purificación de la FSH de lubina y su caracterización bioquímica y funcional. La FSH se obtuvo a partir de hipófisis de lubina mediante extracción alcohólica de glicoproteínas y posterior fraccionamiento en cromatografía de intercambio iónico y de fase reversa. Los análisis realizados mostraron que teníamos fracciones puras de dímero FSH, así como de las subunidades GP- α , FSH- β y LH- β . El peso molecular, estimado por espectrometría de masas, fue de 28.5 KDa para el dímero FSH, 12.6 KDa para GP- α , 13.6 KDa para FSH- β y 15.3 KDa para LH- β . La FSH purificada fue capaz de activar, de forma dosis dependiente, el receptor de FSH de lubina expresado de manera estable en células HEK 293. La FSH también estimulo de manera dosis dependiente la producción de estradiol en cultivos de tejido ovárico de lubina, demostrando que era bioactiva

INTRODUCCIÓN

Las gonadotrofinas (GTHs) producidas por la glándula hipofisaria son hormonas clave en el control de la gametogénesis y el desarrollo gonadal en vertebrados. En peces, la existencia de dos GTHs, la Hormona Estimulante del Folículo (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH), esta ampliamente aceptada como en el resto de vertebrados superiores. Las GTHs junto con la Hormona Estimulante del Tiroides (TSH) forman parte de un grupo de hormonas hipofisarias estrechamente relacionadas. Estructuralmente son glicoproteinas heterodimericas compuestas por una subunidad α , común y una subunidad β , especifica de cada hormona. (1). En teleósteos, se ha sugerido que la FSH promueve las fases iniciales del desarrollo gonadal, mientras que la LH estaría involucrada en las fases finales de maduración de los gametos (2, 3). En el presente trabajo se describe la purificación de la FSH de lubina, *Dicentrarchus labrax*, asi como su caracterización bioquímica y funcional.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la purificación de la FSH, se usaron 1400 glándulas hipofisarias de lubina (aprox. 4.1g). Tras la extracción las hipófisis se congelaron con nitrógeno liquido y se almacenaron a -80° C. Posteriormente se homogenizaron en frio con acetato de amonio al 10%, pH 7-7.5, PMSF 1mM y EDTA 5mM. Mediante extracción alcohólica (40-85% Etanol) se separó la fracción glicoproteica, que fue sometida a cromatografía de intercambio iónico (TSK DEAE-5PW; 21.5 x 150 mm; TosoHaas) en un gradiente de 0-60% de NH₄H₂CO₃ 1M, pH 8, a un flujo de 4ml/min y se recogieron fracciones de 8ml. Los picos obtenidos se fraccionaron de nuevo por cromatografía de fase reversa (RESOURCE 15RPC; Pharmacia Biotech), en un gradiente de 0-50% de acetonitrilo en

CH₃COONH₄ 50mM, pH 8, a un flujo de 1ml/min y fracciones de 1ml. Ambos tipos de cromatografía se realizaron en un equipo de HPLC. Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS/Native-PAGE (15%), Western blot, espectrometría de masas y secuenciación de los amino ácidos N-terminales. Finalmente para los estudios de función se usaron dos líneas celulares (HEK 293) que expresan de manera estable los receptores de FSH o LH de lubina y tejido ovárico de lubina en previtelogenesis.

RESULTADOS

Las glicoproteínas hipofisarias se separaron, mediante cromatografía de intercambio iónico y fase reversa, en distintas fracciones según sus propiedades físico-químicas. Los análisis realizados (Western blot y secuenciación de amino ácidos N-terminales) mostraron que habíamos obtenido fracciones puras de dímero FSH, así como de las subunidades GP- α , FSH- β y LH- β . El peso molecular, estimado por espectrometría de masas, fue de 28.5 KDa para el dímero FSH, 12.6 KDa para GP- α , 13.6 KDa para FSH- β y 15.3 KDa para LH- β . Para la caracterización funcional de la FSH purificada se uso una línea celular (HEK 293) que expresa de manera estable su receptor. La FSH fue capaz de activar, de forma dosis dependiente, el receptor de FSH de lubina, sin embargo no estimuló el receptor de LH. La activación por FSH se medio indirectamente por cambios en la actividad luciferasa, promovida por un aumento del AMP cíclico intracelular. La FSH purificada también estimulo de manera dosis dependiente la producción de estradiol en cultivos de tejido ovárico de lubina en estado de previtelogenesis.

DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que la FSH endógena purificada era capaz de activar su receptor y promover la síntesis de estradiol de manera dosis dependiente, demostrando ser una proteina bioactiva que puede ser usada para estudios posteriores relacionados con la gametogénesis en esta especie.

Agradecimientos

Estudio financiado por la Unión Europea (Q5RS-2000-31365) y el Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2002-10024E; AGL2002-12470-E y AGL2000-1454). G.M. disfruta de una beca I3P del CSIC.

- 1. Pierce JF, Parsons TF 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 465-495
- 2. Swanson P, Dickey JT, Campbell B 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 53-59
- 3. Yaron Z, Gur G, Melamed P, Rosenfeld H, Elizur A, Levavi-Sivan B 2003. Regulation of fish gonadotropins. *Int. Rev. Cytol.* 225: 131-185

SEASONAL CHANGES IN THE DAILY RHYTHMS OF INDOLES, MELATONIN AND OTHER 5-METHOXYINDOLES IN THE PINEAL ORGAN OF TROUTS EXPOSED TO NATURAL PHOTOPERIOD

R.M. Ceinos, A. Rodríguez-Illamola, M. Gesto, S. Sangiao-Alvarellos, J.L. Soengas, J.M. Míguez

Lab. Fisiología, Facultad de Biología, Universidad de Vigo. 36310 Vigo. Spain.

ABSTRACT. The study describes the annual changes in the daily rhythms of melatonin, serotonin (5-HT), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), 5methoxytriptamine (5-MT), 5-methoxytryptophol (5-MTOL), methoxyindoleacetic acid (5-MIAA) in the organ pineal of trout kept under natural lighting conditions. Changes in N-acetyl transferase (NAT) and hydroxyindol-o-methyl transferase (HIOMT) activities were also tested. Daily melatonin levels were high during the dark phase in all seasons with the highest amplitude of melatonin peak found in winter and the lowest in autumn. The NAT activity was very high in winter and low in summer in spite of a higher temperature in the latter. Significant rhythms were observed in 5-HT and 5-HIAA levels with increases in the onset of either the scotophase or the photophase during winter and autumn. No changes were noted for 5-MT in winter and summer, while 5-MTOL and 5-MIAA displayed marked variations similar to those of melatonin. These results suggest that photoperiod mainly regulates the rhythm of several 5-methoxyindoles, including melatonin, in trout pineal organs whilst indolic content seem to be modulated by the amplitude and duration of the nocturnal melatonin peak.

INTRODUCTION

The pineal organ of fish produces melatonin following a 24h rhythm, being synthesis and release low during the day and high at night. These rhythms result from the effect of light on the NAT activity (1), which converts 5-HT to N-acetylserotonin. The subsequent action of HIOMT forms melatonin. In addition, the pineal organ contains other indoles and methoxiyndoles that exhibit daily variations under controlled light-dark cycles (2). The duration in nocturnal melatonin synthesis in fish pineal organ depends on the lenght of the night, which is the basis for the existence of seasonal changes in the rhythm of melatonin. In addition temperature could contribute to seasonal variations in the synthesis of this hormone. The objectives of the present study were *i*) to describe the seasonal changes in the daily rhythms of indoles and 5-methoxyindoles content in pineal organs of trout kept under natural photoperiod, *ii*) to examine the relationship between rhythms of melatonin and the activity of enzymes (NAT and HIOMT) involved in its synthesis pathway.

MATERIAL AND METHODS

Immature rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) were kept in 400L tanks with circulating tap water, natural light and non-controlled temperature. After acclimation, trout were sacrificed under anesthesia at different times of day and night. Sampling was carried out in december, april, june and october. The levels of indoles in pineal organs were measured by HPLC-CD. Melatonin, 5-MTOL, 5-MT, 5-MIAA and enzymatic assays (NAT and HIOMT) were determined by HPLC with fluorimetric detection in the same pineal organ (2).

RESULTS AND DISCUSSION

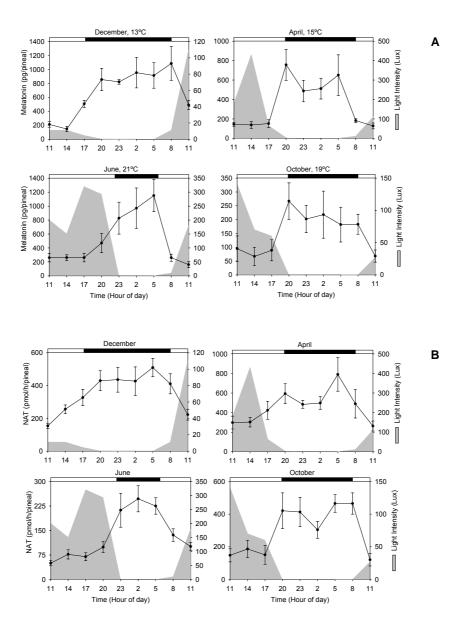


Figure 1. A and B. Daily and seasonal profiles of (A) melatonin and (B) NAT activity in pineal organs of trout kept under natural photoperiod. The dark area represents the intensity light during the day of sampling in each season. Black bars indicate the approximate duration of darknes in each season.

The content of 5-HT in trout pineal organ showed two marked daily peaks located at dusk and dawn. A decrease in 5-HT levels at night was found in december, april and october, but not in june. The levels of 5-HIAA were similar with those of 5-HT, but daily changes in the oxidative metabolite were less pronounced (data not shown).

Pineal melatonin levels display daily rhythms with higher values during the night than during the day in all seasons. Duration of melatonin rhythm was according to the duration of the dark phase, whilst amplitude was lower in autumn than in the other times of the year. Similary to melatonin, NAT activity showed significant daily changes in all seasons with peaks during the night-time. Amplitude of NAT activity was scarcely affected by season, which could be explained by the fact that enzymatic assays were done *in vitro*, then by using the same temperature. No clear daily fluctuations were observed for HIOMT activity in any of the photoperiods (data not shown), although it showed a tendency to increase during the nighttime.

The daily profiles of 5-MT levels were quite similar to those of 5-HT, with a decrease at night in all seasons, except in summer. In april a dramatic decrease in 5-MT levels was observed at night. The pineal content in 5-MTOL also increased at night in december, april and june. Daily rhythms of 5-MIAA were observed in all seasons with peaks in the dark phase (data not shown).

The data obtained further support the idea that seasonal rhythms of pineal melatonin synthesis in trout are regulated mainly by photoperiod. The duration of melatonin rhythm was correlated with the night length in each season, which limits the duration of the nocturnal NAT activity (1). The amplitude of nocturnal melatonin peak was high in summer and very low in autumn, in spite of water temperature was similar in both seasons. These data indicate that amplitude of nocturnal melatonin peak might be influenced by a combination of both photoperiod and temperature. The data also support that both 5-HT and melatonin synthesis might be coupled processes and both are affected by the prevailing photoperiod. Most of non-melatonin 5-methoxyindoles also displayed marked daily and seasonal changes, which were related to day-night and seasonal variations of photoperiod.

Acknowledgements

This research was supported by grants from MEC-FEDER (AGL-2004-08137-c04-03/ACU).

REFERENCES

- 1. Falcón J. 1999. Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog. Neurobiol.*58:121-162
- Ceinos RM, Rábade S, Soengas JL, Miguez JM. 2005. Indoleamines and 5-methoxyindoles in trout pineal organ in vivo: Daily changes and influence of photoperiod. Gen. Comp. Endocrinol. 144: 76-68

EFECTO DE LA EDAD SOBRE EL RITMO CIRCADIANO DEL NEUROTRANSMISOR SEROTONINA EN LA TÓRTOLA COLLARIZA (Streptopelia roseogrisea)

S.D. Paredes, M.P. Terrón, V. Valero, C. Barriga, A.B. Rodríguez

Dpto. Fisiología. Universidad de Extremadura. España.

RESUMEN. Teniendo en cuenta que la serotonina interviene en la regulación homeostática del sueño, se evaluó si el envejecimiento ejercía modificaciones sobre su ritmo circadiano. Los resultados mostraron una reducción de la amplitud del ritmo del neurotransmisor en animales viejos, al compararla con la obtenida en jóvenes, pudiéndose concluir que el ritmo circadiano de serotonina sufre variaciones con la edad en el modelo de estudio utilizado. Estas variaciones podrían estar relacionadas con los cambios en los parámetros de sueño que aparecen típicamente durante la vejez.

INTRODUCCIÓN

La serotonina es un producto intermediario del metabolismo del triptófano que se encuentra localizado esencialmente en las células enterocromafines del intestino, las células serotonérgicas del cerebro, y las plaquetas y el suero sanguíneo. Recientes investigaciones han puesto de manifiesto que este compuesto, además de ejercer una función bien establecida como neurotransmisor del sistema nervioso central, participa en la neuromodulación del sueño (1). Asimismo, la estrecha relación existente entre la actividad serotonérgica y los ajustes de fase circadianos sugieren que la serotonina juega también un papel en la regulación endógena del reloj circadiano (2). Se han descrito numerosos cambios en el sueño de animales y seres humanos como consecuencia del envejecimiento, siendo uno de los más frecuentemente documentados la atenuación de la amplitud de los ritmos de los diferentes elementos que intervienen en el mismo (3). Sin embargo, apenas existen estudios sobre los cambios que pudiera sufrir la serotonina como consecuencia de la edad. Por todo ello, nos propusimos establecer los ritmos circadianos de serotonina en dos grupos de edad diferenciados y observar las posibles variaciones que podrían darse entre ellos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo se utilizaron tórtolas collarizas (*Streptopelia roseogrisea*) machos y hembras a las que se dividió en dos grupos (n=10): jóvenes, animales de 2-3 años de edad, y viejas, animales de 10-12 años de edad. Estos animales se caracterizan por poseer un ritmo de actividad/reposo similar al de los seres humanos, manifestándose su mayor actividad por el día y el descanso durante la noche. Los individuos utilizados en la investigación se criaron en nuestro laboratorio, fueron ubicados separadamente en jaulas de 25x25x25 cm en una habitación con ventilación e iluminación artificiales, mantenidos a temperatura constante de 22º C con agua y comida *ad libitum*, y se expusieron a un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (periodo oscuro de 20:00 a 08:00 horas).

El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Extremadura (Badajoz, España), de acuerdo con la guía sobre el uso y cuidado de los animales de laboratorio del Instituto Nacional de la Salud.

Las muestras sanguíneas fueron obtenidas a intervalos de tres horas (desde las 09:00 a las 18:00) durante el periodo diurno y de una hora (desde las 21:00 a las 06:00) durante el nocturno, a partir de la vena braquial de animales escogidos al azar, mediante jeringa hipodérmica de 1 ml. La sangre fue posteriormente transferida sin heparinizar a tubos con gel separador de suero y centrifugada a temperatura ambiente durante 15 minutos a 3000 rpm. El suero obtenido fue alicuotado en tubos Eppendorf y congelado a -30 °C hasta el momento de su utilización.

Los niveles de serotonina sérica se determinaron mediante un "kit" comercial de ELISA (IBL) para la cuantificación de la serotonina transformada químicamente en las diferentes muestras. La preparación de las muestras, es decir, la transformación de serotonina en acilserotonina, formaba parte de la dilución de las muestras y se llevó a cabo mediante la incubación de cada una de las muestras con el "reactivo de acilación" proporcionado por la casa comercial. El protocolo experimental se basó en el principio de competición de ELISA a través del cual antígenos biotinilados (que han adquirido un grupo biotinilo) y no biotinilados (serotonina) competían por un número fijo de sitios de unión a anticuerpos, de tal modo que la cantidad de antígenos biotinilados ligados a anticuerpos era inversamente proporcional a la concentración de serotonina de la muestra. Una vez que el sistema alcanzó el equilibrio, se procedió a la eliminación mediante lavado de los antígenos biotinilados no unidos, y los unidos se determinaron utilizando como marcador fosfatasa alcalina antibiotina y PNPP como sustrato. Las muestras problema se cuantificaron comparando la actividad enzimática de las mismas con una curva realizada a partir de concentraciones conocidas de serotonina.

Una vez determinado el ritmo circadiano de neurotransmisor para cada grupo de edad se procedió a determinar la función senoidal de los resultados obtenidos tanto en animales jóvenes como en viejos, parámetro necesario en el estudio cronobiológico de la variable analítica neurotransmisor serotonina. Para ello se utilizó la ecuación Y=y0+A•sin(ft+phi), donde y0 es el mesor (valor medio de la función ajustada), A es la amplitud (diferencia entre el valor máximo y el valor medio de la función ajustada) y phi es el desfase. La frecuencia (f) se fijó para periodos de 24 horas, de este modo se estableció un valor para la misma de 0,2618.

Los resultados se analizaron estadísticamente mediante el test de la U de Mann-Whitney. Se consideró que no había significación cuando el valor de probabilidad de la significación (P) fue mayor de 0,05. Así, se dio el valor de "significativo" a P<0.05.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos mostraron la existencia de ritmos circadianos de niveles séricos de serotonina tanto en animales jóvenes como en viejos, siendo los valores del día superiores a los alcanzados durante la noche. Así, en las tórtolas jóvenes se lograron datos significativamente mayores (*P*<0,05) a las 09:00, las 18:00, las 21:00 y las 06:00 con respecto a las 12:00, 23:00, 00:00, 01:00, 02:00, 03:00, 04:00, y 05:00, además de a las 18:00 con respecto a las 09:00 y las 06:00, así como a las 09:00 con respecto a las 06:00. También fueron significativamente mayores los valores de las 22:00 (con respecto a las 12:00, 00:00, 01:00, 02:00, 03:00, 04:00, y 05:00), las 15:00 (con respecto a las 00:00, 01:00, 03:00 y 05:00), las 12:00 (con respecto a las 00:00, 01:00, 02:00, 03:00, 04:00 y 05:00), las 12:00 (con respecto a la 01:00). En el caso de las viejas, hubo aumentos significativos a las 18:00, las 21:00 y las 06:00 con respecto a las 09:00, 12:00, 23:00, 00:00, 01:00, 02:00,

03:00, 04:00, y 05:00. Igualmente se obtuvieron valores significativamente mayores a las dos primeras horas mencionadas con respecto al valor de las 15:00. Asimismo, el valor de las 09:00 fue significativamente mayor con respecto a los de la 01:00 y las 02:00, y el de las 15:00 con respecto al de las 02:00. Por otro lado, a todas las horas analizadas los valores de serotonina en jóvenes fueron significativamente mayores que en viejos, excepto a las 00:00, 01:00, 03:00 y 04:00. Al ajustar senoidalmente ambos ritmos circadianos se observó que el máximo de secreción se situaba en torno a las 15:00 en el caso de las jóvenes y en torno a las 16:00 en el caso de las viejas. El valor de amplitud para los primeros fue de -70,321±20,5, mientras que para los segundos fue de -47,882±21,8).

DISCUSIÓN

A mediados del siglo pasado, diferentes experimentos apoyaron la creencia de que la serotonina actuaba como un verdadero modulador del sueño, ya que la destrucción de las neuronas serotonérgicas del sistema del rafe o la inhibición de la síntesis de serotonina por medio de p-clorofenilalanina inducían un insomnio severo que podía revertirse si se reestablecía la síntesis de serotonina. Sin embargo, la demostración de que la actividad eléctrica de los somas serotonérgicos y la liberación de serotonina se incrementaban durante la vigilia y disminuían durante el sueño se encontraba en clara contradicción con la hipótesis planteada. A pesar de esto, experimentos más recientes sugieren que la serotonina sería la responsable de iniciar durante la vigilia una cascada de procesos genómicos postsinápticos en algunas neuronas hipnogénicas situadas en el área preóptica. De este modo, la liberación de serotonina durante la vigilia conduce a una regulación homeostática del sueño de onda lenta (4). Nuestros resultados muestran que a pesar de que el ritmo circadiano de serotonina se mantiene en tórtolas viejas, la amplitud del mismo se encuentra muy reducida con respecto a la de los animales jóvenes, siendo la de estos un 30% mayor que la de los animales viejos, lo que podría tener, teniendo en cuenta todo lo expuesto, implicaciones en las alteraciones de sueño características de la vejez.

Agradecimientos

Esta investigación forma parte de un proyecto subvencionado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFI2002-04583-FC02-01). S.D. Paredes disfruta de una beca de investigación concedida por la Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología – Fondo Social Europeo (Junta de Extremadura, FIC02A049). Los autores desean expresar su agradecimiento a Elena Circujano Vadillo, Ricardo Megías Cebrino y Ana Royano Sánchez por su asistencia técnica.

- 1. Ursin R 2002 Serotonin and sleep. Sleep Med Rev 6:55-69.
- Glass JD, DiNardo LA, Ehlen, JC 2000 Dorsal raphe nuclear stimulation of SCN serotonin and circadian phase-resetting. Brain Res 859:224-232
- Pandi-Perumal SR, Seils LK, Kayumov L, Ralph MR, Lowe A, Moller H, Swaab DF 2002 Senescence, sleep, and circadian rhythms. Ageing Res Rev 1:559-604
- 4. Jouvet M 1999 Sleep and serotonin: an unfinished story. Neuropsychopharmacology 21:24-27

CORRELACIONES ENTRE LOS RITMOS CIRCADIANOS DE MELATONINA, SEROTONINA Y ACTIVIDAD/REPOSO EN TÓRTOLAS COLLARIZAS (Streptopelia roseogrisea) JÓVENES Y VIEJAS

S.D. Paredes, M.P. Terrón, V. Valero, C. Barriga, A.B. Rodríguez

Dpto. Fisiología. Universidad de Extremadura. España.

RESUMEN. Se investigó mediante estudios de correlación la relación existente entre los ritmos circadianos de la hormona pineal melatonina y el neurotransmisor serotonina, elementos cuya modulación sobre el sueño es bien conocida, con los ritmos de actividad/reposo de tórtolas collarizas jóvenes y viejas. Se obtuvieron correlaciones positivas al relacionar actividad con serotonina, y negativas al hacerlo con melatonina, observándose variaciones en los factores de correlación como consecuencia de los cambios característicos que induce el envejecimiento.

INTRODUCCIÓN

Se ha observado que los ritmos circadianos, entre los que se incluyen los ritmos de actividad-reposo, de sueño-vigilia, de temperatura corporal, de niveles hormonales y del sistema inmune sufren alteraciones con la edad. Así, durante el envejecimiento se producen cambios en el sueño que se caracterizan por frecuentes despertares durante el mismo, adelantos en las horas de despertarse e irse a dormir y disminución de la producción rítmica de la hormona pineal melatonina, cuya secreción circadiana se relaciona desde el punto de vista fisiológico con procesos normales de sueño (1). Por otro lado, diversos estudios también han relacionado la secreción del neurotransmisor serotonina con la regulación homeostática del sueño de onda lenta (2), actuando además como modulador positivo para la síntesis de melatonina (3). En la mayor parte de los estudios realizados sobre sueño y cambios circadianos como consecuencia de la edad el modelo experimental elegido han sido mamíferos de actividad nocturna y mayoritariamente polifásicos. Sin embargo, el ser humano se caracteriza por ser monofásico y poseer actividad diurna, elementos que definen a su vez a las aves. Por todo ello, se estudió si existían correlaciones de los ritmos circadianos de melatonina y serotonina y actividad-reposo en animales pertenecientes a dos grupos de edad diferenciados con el fin de establecer si las alteraciones de los ritmos de hormona y neurotransmisor como consecuencia de la edad afectaban al sueño del modelo animal estudiado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo se utilizaron tórtolas collarizas (*Streptopelia roseogrisea*) machos y hembras a las que se dividió en dos grupos (n=10): jóvenes, animales de 2-3 años de edad, y viejas, animales de 10-12 años de edad. Los animales, criados en nuestro laboratorio, fueron ubicados separadamente en jaulas de metacrilato transparente de 25x25x25 cm en una habitación con ventilación e iluminación artificiales, mantenidos a temperatura constante de 22º C con agua y comida *ad libitum*, y se expusieron a un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad (periodo oscuro de 20:00 a 08:00 horas). El estudio fue aprobado por el Comité Ético de la Universidad de Extremadura (Badajoz, España), de acuerdo con la guía

sobre el uso y cuidado de los animales de laboratorio del Instituto Nacional de la Salud. Para cuantificar los ritmos de actividad/reposo, se instaló en cada una de las jaulas, un sistema de detección de actividad (actímetros) consistente en dos emisores de haces infrarrojos perpendiculares entre sí y enfrentados a dos receptores sintonizados para responder únicamente a la frecuencia de los emisores (4866 Hz), evitando, de esta forma, posibles interferencias de otras fuentes de radiación. La información detectada por los actímetros se procesó mediante el programa informático "Das 16" (4), contabilizándose de este modo los pulsos de actividad, o número de veces que los animales interrumpían los haces infrarrojos, por animal y por hora. Las muestras sanguíneas fueron obtenidas a intervalos de tres horas (desde las 09:00 a las 18:00) durante el periodo diurno y de una hora (desde las 21:00 a las 06:00) durante el nocturno, a partir de la vena braquial de animales escogidos al azar, mediante jeringa hipodérmica de 1 ml. La sangre fue posteriormente transferida sin heparinizar a tubos con gel separador de suero y centrifugada a temperatura ambiente durante 15 minutos a 3000 rpm. El suero obtenido fue alicuotado en tubos Eppendorf y congelado a -30 °C hasta el momento de su utilización. Los niveles de serotonina y melatonina sérica se "kits" cuantificaron mediante comerciales (IBL) de ELISA radioinmunoensavo, respectivamente. Las determinaciones se llevaron a cabo en ambos casos por duplicado y los resultados se expresaron como ng/ml, en el caso de la serotonina, y como pg/ml en el caso de la melatonina. Una vez determinados los ritmos circadianos de neurotransmisor y hormona para cada grupo de edad se procedió a correlacionar los datos de los mismos con los obtenidos a su hora correspondiente en los estudios de actividad/reposo. Para ello, se realizó un test de regresión múltiple, considerándose como estadísticamente significativos aquellos valores cuyo factor de correlación (R²) era superior a 0,5.

RESULTADOS

Los resultados indicaron la existencia de correlaciones negativas al enfrentar los datos de melatonina obtenidos con los pulsos de actividad, tanto en animales jóvenes como en viejos, siendo el coeficiente de correlación para los primeros de 0,7025 y para los últimos de 0,8853, lo que supone que a medida que los niveles de melatonina en suero van aumentando, los pulsos de actividad disminuyen y viceversa. Al enfrentar los diferentes valores del neurotransmisor serotonina con los pulsos de actividad, se obtuvo en el caso de las tórtolas jóvenes una correlación positiva, cuyo coeficiente alcanzó un valor de 0,9136. También en el caso de las tórtolas viejas se obtuvo un coeficiente de correlación positivo, cuyo valor sin embargo disminuyó hasta 0,5417, estableciéndose de este modo una correlación moderadamente positiva entre los niveles de neurotransmisor en animales viejos y los pulsos de actividad realizados por los mismos. Por consiguiente, y al contrario de lo que ocurre con la hormona pineal, a medida que aumentan los niveles séricos de serotonina se produce un acrecentamiento de los pulsos de actividad, y viceversa.

DISCUSIÓN

El sexo del individuo y las enfermedades psiquiátricas y psicosomáticas, y en gran medida la mayoría de las físicas, además del envejecimiento, son algunos de los factores determinantes del sueño. Sin embargo, de todos los agentes mencionados el envejecimiento es probablemente el elemento más destacado pues se considera que ejerce un papel fundamental a la hora de

evaluar cómo los individuos van a dormir de manera característica. Así, v de forma general, tanto la cantidad como la calidad del sueño se van a ver perjudicadas considerablemente durante la vida a medida que la edad avanza (5). De acuerdo a nuestros resultados, se produjeron correlaciones negativas al relacionar melatonina y ritmos de actividad en ambos grupos de edad, lo que se debe a las propiedades cronobióticas de la mencionada hormona, además de su capacidad para inducir somnolencia transitoria o sueño. En este sentido, se ha observado que el aumento característico de melatonina que se produce durante el periodo nocturno se relaciona directamente con un incremento de la somnolencia y una disminución de la temperatura corporal (6), lo que avala el efecto hipnótico observado en nuestro modelo de estudio. El hecho de que siga habiendo una correlación negativa entre el ritmo circadiano de melatonina y el de actividad en el caso de las tórtolas viejas es indicativo de que el ritmo circadiano de melatonina no desaparece en este grupo de edad, siendo los valores diurnos inferiores a los nocturnos, sino que se atenúa considerablemente. En el caso de la serotonina se obtuvieron correlaciones positivas en los dos grupos de edad. Sin embargo, el coeficiente de correlación al enfrentar la serotonina de tórtolas viejas con sus pulsos de actividad fue muy inferior al obtenido en las jóvenes, lo que sería un reflejo de las alteraciones que se producen como consecuencia del envejecimiento en la neuromodulación del sueño ejercida por este neurotransmisor. Estos resultados podrían ofrecer en parte una base para el futuro desarrollo de nuevas investigaciones dirigidas a la aplicación de la melatonina y la serotonina en terapias en el caso de las alteraciones del sueño como consecuencia de la edad.

Agradecimientos

Esta investigación forma parte de un proyecto subvencionado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFI2002-04583-FC02-01). S.D. Paredes disfruta de una beca de investigación concedida por la Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología – Fondo Social Europeo (Junta de Extremadura, FIC02A049). Los autores desean expresar su agradecimiento a Elena Circujano Vadillo, Ricardo Megías Cebrino y Ana Royano Sánchez por su asistencia técnica.

- Myers BL, Badia P 1995 Changes in circadian rhythms and sleep quality with aging: mechanisms and interventions. *Neurosci Biobehav Rev* 19:553-71. Fe de erratas en: 1996 *Neurosci Biobehav Rev* 20:I-IV.
- 2. Jouvet M 1999 Sleep and serotonin: an unfinished story. Neuropsychopharmacology 21:24-27
- Huether G, Poeggeler B, Adler L, Ruther E 1993 Effects of indirectly acting 5-HT receptor agonists on circulating melatonin levels in rats. Eur J Pharmacol 238:249-254
- 4. Diez-Noguera A, de la Iglesia HO, Cambras T, Schwartz WJ 2004 Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. *Curr. Biol* 14:796-800
- Bliwise DL 2000 Normal aging. En: Principles and practice of sleep medicine, Kryger MH, Roth T, Dement DW (Eds.), 3rd Edition. WB Sauders, Philadelphia, pp. 26-42.
- Dijk DJ, Cajochen C 1997 Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG. J Biol Rhythms 12:627-635.

CAMBIOS EN LOS NEUROTRANSMISORES CEREBRALES EN LA TRUCHA ARCO IRIS TRAS LA EXPOSICIÓN A NAFTALENO

M. Gesto, A. Tintos, R.M. Ceinos, A. Rodríguez-Illamola, J.L. Soengas, J.M. Míguez

Laboratorio de Fisioloxía Animal, Facultade de Ciencias do Mar, Edificio de Ciencias Experimentáis, Universidade de Vigo, 36310, España.

RESUMEN. En este estudio se evaluaron los efectos del naftaleno (uno de los hidrocarburos aromáticos policíclicos más simples) a diferentes intervalos de tiempo, sobre los niveles de neurotransmisores en distintas regiones cerebrales de la trucha arco iris. Los resultados mostraron distintas alteraciones de la neurotransmisión dopaminérgica y serotoninérgica dependiendo de la región cerebral y del tiempo de exposición. Se sabe que los hidrocarburos aromáticos policíclicos pueden actuar como disruptores endocrinos. En este caso el naftaleno podría alterar el estado endocrino actuando a través de los sistemas de neurotransmisores cerebrales.

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son un grupo muy importante de contaminantes químicos en el medio acuático. Sus fuentes principales son antropogénicas: vertidos domésticos e industriales, deposición atmosférica, mareas negras accidentales, etc. Se ha demostrado que varios HAPs son potencialmente mutagénicos, carcinogénos o genotóxicos. Algunos HAPs actúan también como disruptores endocrinos debido a su estructura química, alterando los niveles y la funcionalidad de varias hormonas: esteroides sexuales (1), cortisol (2), etc. Estos efectos podrían estar mediados por una acción de los HAPs sobre los centros neurales que regulan la secreción hormonal. Sin embargo, son muy escasos los estudios acerca del efecto de HAPs sobre la neurotransmisión cerebral (3). En este trabajo hemos estudiado la capacidad del naftaleno (uno de los HAPs más simples) de modificar los niveles de distintos neurotransmisores en el cerebro de la trucha arco iris a corto (horas) y medio plazo (días).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron truchas arco iris inmaduras (*Oncorhynchus mykiss*) de alrededor de 100 gramos de peso corporal, suministradas por una piscifactoría comercial (Soutorredondo, Noia). Loa animales se aclimataron durante al menos dos semanas a las instalaciones de la Facultad de Ciencias del Mar en Vigo, en acuarios con circulación abierta de agua y bajo condiciones de fotoperiodo y temperatura naturales.

En un primer experimento las truchas fueron anestesiadas (por inmersión en una solución de MS-222, 50 mg/L), pesadas, e inyectadas intraperitonealmente (2 μ L/g) con aceite vegetal solo o conteniendo naftaleno (10 y 50 mg/kg pez). Fueron sacrificadas a 1, 3 y 6 horas tras la inyección.

Un segundo experimento fue realizado de forma similar pero las truchas fueron implantadas intraperitonealmente con aceite de coco solo o conteniendo naftaleno (10 y 50 mg/kg pez) y sacrificadas a 1, 3 y 5 días tras la inyección.

En ambos casos se midieron los niveles de catecolaminas (noradrenalina, dopamina) e indolaminas (serotonina) y sus principales catabolitos asociados

en distintas regiones cerebrales (telencéfalo, hipotálamo, hipófisis, área preóptica, médula oblongata).

RESULTADOS

Se han observado cambios en los niveles de neurotransmisores aminérgicos cerebrales de la trucha tras la exposición a naftaleno. Estos cambios fueron diferentes dependiendo del periodo de exposición al hidrocarburo y de la región cerebral.

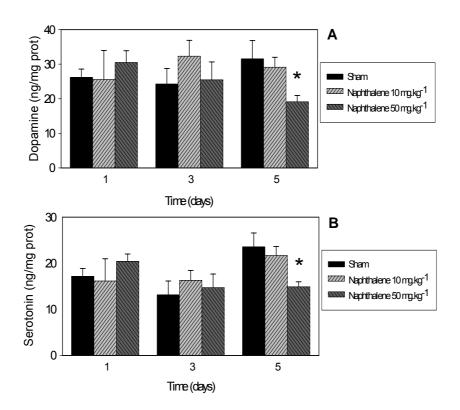


Figura 1. Niveles de dopamina y serotonina en el hipotálamo de truchas arco iris tras 1, 3 y 5 días de exposición a dos dosis de naftaleno. Los valores son medias ± EEM (n =8). *: Diferencias significativas con respecto al grupo control (sham).

A corto plazo (6 horas) se observaron incrementos significativos en los niveles de dopamina (DA), serotonina (5HT) y ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) en el hipotálamo. De forma similar se observaron incrementos en los niveles de 5HIAA y 5HT en el telencéfalo. En esta misma región, se produjo un descenso en los niveles de 5-hidroxitriptófano (5HTP), el precursor de la síntesis de serotonina. Las demás regiones cerebrales presentaron modificaciones de menor importancia.

Tratamientos a medio plazo (5 días) con la dosis de naftaleno más alta (50 mg/kg pez) produjeron descensos en los niveles de de noradrenalina (NA),

DA, 5HIAA y 5HT en el hipotálamo. En el telencéfalo se observó un descenso en los niveles de 5HTP y de DOPAC (ácido 3,4-dihidroxifenilacético, principal catabolito oxidativo de la dopamina) además de un incremento en el contenido de noradrenalina.

DISCUSIÓN

Todos estos datos están de acuerdo con estudios previos (4), mostrando una acción neurotóxica altamente selectiva de contaminantes del medio acuático sobre las regiones cerebrales que contienen una alta densidad de terminales neuronales aminérgicas, como el hipotálamo o el telencéfalo.

Los cambios observados en los niveles de neurotransmisores cerebrales fueron dependientes del tiempo de exposición al hidrocarburo, sugiriendo que las alteraciones endocrinas inducidas por hidrocarburos aromáticos policíclicos (1,2) podrían estar mediadas, al menos en parte, a través de los sistemas aminérgicos cerebrales.

Agradecimientos

Proyecto subvencionado por MCyT-FEDER (VEM2003-20062).

- Navas JM, Zanuy S, Segner H, Carrillo M 2004 β-Naphthoflavone alters normal plasma levels of vitellogenin, 17b-estradiol and luteinizing hormone in sea bass broodstock. *Aquat. Toxicol.* 67:337-45
- Teles M, Pacheco M, Santos MA 2003 Anguilla anguilla L. liver ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and bnaphthoflavone. Ecotox. Environ. Safe. 55:98-107
- Fingerman SW, Short EC Jr 1983 Changes in neurotransmitter levels in channel catfish alter exposure to benzo(a)pyrene, naphthalene, and AROCLOR 1254. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 30:147-151
- Aldegunde M, Soengas JL, Ruibal C, Andrés MD 1999 Effects of chronic exposure to γ-HCH (lindane) on brain serotonergic and gabaergic systems, and serum cortisol and thyroxine levels of rainbow trout, *Oncorhynchus* mykiss. Fish Physiol. Biochem. 20:325-330

EFECTOS HORMONALES Y METABÓLICOS DE LA EXPOSICIÓN A NAFTALENO EN LA TRUCHA ARCO IRIS Oncorhynchus mykiss

A. Tintos, M. Gesto, S. Sangiao-Alvarellos, R.M. Ceinos, J.M. Míguez, J.L. Soengas

Laboratorio de Fisioloxía Animal, Facultade de Ciencias do Mar, Edificio de Ciencias Experimentais. Universidade de Vigo. E-36310 Vigo. España.

RESUMEN. Se trataron truchas arco iris inmaduras mediante inyección intraperitoneal con dosis crecientes de naftaleno a corto (1-6 horas) y a largo plazo (1-5 días). Los resultados obtenidos apoyan la acción del naftaleno como disruptor endocrino al producir descensos dosis-dependientes en los niveles de cortisol y 17β-estradiol. Se pone de manifiesto el efecto del naftaleno sobre el metabolismo energético hepático que se puede resumir en un incremento en el potencial glucogenolítico, uso de glucosa exógena y glucólisis. Este incremento en la producción de energía puede estar relacionado con el incremento en la actividad detoxificante hepática.

INTRODUCCIÓN

Se sabe que varios hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) que están presentes en aguas contaminadas por petróleo o por derivados petrolíferos pueden actuar como disruptores endocrinos debido a que su estructura química es similar a la de los esteroides de los peces (1). Se conocen algunos de los mecanismos por los que los PAH actúan como disruptores endocrinos en peces (2), pero se desconoce si producen aumentos o descensos en los niveles de esteroides así como su efecto a nivel metabólico.

MATERIAL Y MÉTODOS

En un primer experimento, truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) inmaduras fueron anestesiadas e inyectadas ($0.2~\mu l.g^{-1}$) con aceite vegetal solo (control) o conteniendo naftaleno ($10~y~50~mg.kg^{-1}$). 1, 3 y 6 h tras inyección se tomaron muestras de 8 peces por grupo. Un segundo experimento se diseñó de un modo similar pero usando peces implantados intraperitonealmente ($10~\mu l.g^{-1}$) con aceite de coco solo (control) o conteniendo naftaleno ($10~y~50~mg.kg^{-1}$) siendo muestreados 8 peces por grupo tras 1, 3 y 5 días del implante. Tras anestesiar a los animales se tomaon muestras de plasma e hígado. En cada pez se midieron niveles de cortisol y 17β -estradiol mediante ELISA, asi como parámetros metabólicos en plasma e hígado mediante métodos espectrofotométricos.

RESULTADOS

Los niveles de cortisol (Fig. 1) y 17β-estradiol (datos no mostrados) descendieron tras exposición a naftaleno tanto a corto como a largo plazo. Los niveles de glucosa y lactato en plasma se incrementaron de un modo dosisdependiente a corto y largo plazo (datos no mostrados). En hígado el tratamiento con naftaleno a largo plazo (Tabla 1) produjo descensos dosisdependientes en los niveles de glucógeno y en las actividades FBPase y GDH. Se produjeron asimismo incrementos dosis-dependientes en las actividades GPase, PK, HK y GK. Los resultados obtenidos en hígado tras el tratamiento a corto plazo fueron similares (datos no mostrados).

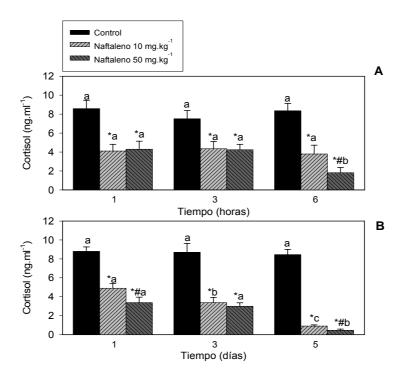


Figura 1. Cambios en los niveles de cortisol en plasma de trucha arco iris tras tratamiento con aceite vegetal solo (control) o conteniendo naftaleno (10 y 50 mg.kg⁻¹) que se muestrearon 1-6 horas (A) o 1-5 días (B) tras inyección. Cada valor es la media ± SEM de 8 peces. *, significativamente distinto del control. #, significativamente distinto de los peces tratados con la dosis menor de naftaleno. Letras distintas indican diferencias significativas entre tiempos dentro de cada tratamiento.

DISCUSIÓN

La exposición a naftaleno alteró significativamente los niveles de hormonas esteroideas lo que apoya el papel de este PAH como disruptor endocrino. Los niveles de cortisol descendieron de un modo dosis-dependiente en los peces tratados con naftaleno tras tratamientos a corto (1-3 horas) y a largo (1-5 días) plazo. Ello sugiere que el naftaleno inhibe la respuesta del cortisol en plasma confirmando la hipótesis de una disrupción de la secreción interrenal de cortisol (3). Los niveles de 17β-estradiol) también muestran descensos dosisdependientes tras tratamientos con naftaleno a corto y largo plazo lo que también sugiere una acción disruptora del naftaleno sobre la síntesis y liberación de hormonas desde la gónada. Los cambios a nivel metabólico en plasma ponen de manifiesto que el naftaleno produce un aumento en la disponibilidad de combustibles en plasma (glucosa y lactato). En hígado el naftaleno produce cambios dosis-dependientes en varias rutas como son el incremento en el potencial glucogenolítico (descenso glucógeno e incremento actividad GPasa), aumento en el uso de glucosa exógena (actividades HK y GK), descenso en la capacidad gluconeogénica (actividad FBPasa), incremento en la capacidad glucolítica (actividad PK) e descenso en el catabolismo de amino ácidos (actividad GDH). Todos estos cambios sugieren, por primera vez en peces, que la exposición a PAH induce un incremento en la capacidad de producción de energía en el hígado. Este incremento en la producción de energía puede estar relacionado con los cambios en la actividad de enzimas antioxidantes y detoxificantes demostradas en hígado de peces expuestos a PAH tanto en este estudio como en trabajos previos.

Tabla 1. Cambios en los niveles de metabolitos (μ mol. g^{-1}) y actividades enzimáticas (U. mg^{-1} proteína) en hígado de trucha arco iris. Para otros detalles ver la leyenda de la Figura 1.

i iguia i.		Tiempo tras tratamiento (días)			
Parametro	Grupo	1	3	5	
Glucógeno	Control	195 ± 8.40a	183 ± 9.28a	179 ± 10.3a	
	N-10	146 ± 4.97*a	96.9 ± 4.75*b	78.7 ± 4.47 *b	
	N-50	107 ± 3.09*#a	70.4 ± 5.11*#b	38.4 ± 4.49*#c	
Glucosa	Control	33.3 ± 2.81a	30.1 ± 1.38a	28.4 ± 2.51a	
	N-10	43.1 ± 2.47*ab	52.1 ± 3.79*a	39.2 ± 1.76*b	
	N-50	45.6 ± 2.90*a	74.6 ± 3.88*#b	54.4 ± 4.11*#a	
Lactato	Control	$3.28 \pm 0.14a$	3.29 ± 0.12a	3.33 ± 0.16a	
	N-10	$3.43 \pm 0.31a$	3.91 ± 0.32*a	3.37 ± 0.28a	
	N-50	4.40 ± 0.37*#a	6.27 ± 0.54*#b	4.25 ± 0.24*#a	
GPasa	Control	$0.83 \pm 0.06a$	$0.79 \pm 0.05a$	$0.81 \pm 0.07a$	
	N-10	$0.92 \pm 0.08a$	$0.92 \pm 0.06a$	1.14 ± 0.07*b	
	N-50	1.06 ± 0.06a	1.17 ± 0.05*#a	1.38 ± 0.04 *#b	
PK	Control	3.41 ± 0.18a	3.53 ± 0.21a	3.57 ± 0.14a	
	N-10	$3.78 \pm 0.24a$	$3.84 \pm 0.14a$	4.56 ± 0.22 *b	
	N-50	3.89 ± 0.17*a	4.21 ± 0.12*ab	4.62 ± 0.19*b	
HK	Control	$0.14 \pm 0.005a$	0.13 ± 0.006a	0.12 ± 0.008a	
	N-10	0.17 ± 0.008*a	0.16 ± 0.007*a	$0.12 \pm 0.006b$	
	N-50	0.28 ± 0.01*#a	0.20 ± 0.008 *#b	0.18 ± 0.008 *b	
GK	Control	$0.99 \pm 0.07a$	1.12 ± 0.08a	1.03 ± 0.07a	
	N-10	1.74 ± 0.09*a	2.14 ± 0.17*b	2.18 ± 0.19*b	
	N-50	4.56 ± 0.25*#a	5.51 ± 0.35*#b	4.74 ± 0.46*#ab	
FBPasa	Control	$0.57 \pm 0.03a$	$0.61 \pm 0.03a$	$0.59 \pm 0.03a$	
	N-10	$0.53 \pm 0.02a$	$0.52 \pm 0.02a$	0.48 ± 0.02 *a	
	N-50	$0.51 \pm 0.02a$	$0.49 \pm 0.02*a$	0.43 ± 0.02 *b	
GDH	Control	$0.97 \pm 0.03a$	1.03 ± 0.03a	$0.95 \pm 0.02a$	
	N-10	$0.90 \pm 0.03a$	0.82 ± 0.04 *a	0.76 ± 0.04*a	
	N-50	0.77 ± 0.04*#a	0.75 ± 0.03*a	0.71 ± 0.06*a	

Agradecimientos

Estudio financiado por los proyectos VEM2003-20062 (Ministerio de Ciencia y Tecnología-FEDER) y PGIDT04PXIC31208PN (Xunta de Galicia).

- Johnson LL, Sol SY, Ylitalo GM, Horn T, French B, Olson OP, Collier TK 1998 Reproductive anomalies in bottomfish from the Hylebos waterway. Puget Sound res 712-722
- 2. Navas JM, Segner H 2000 Antiestrogenicity of β-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquat Toxicol* 51:79-92
- 3. Teles M, Pacheco M, Santos MA 2003 Anguilla anguilla L. Liver ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and β-naphthoflavone. *Ecotox Environ Safe* 55:98-107

AGREGACIÓN DE CÉLULAS PANCREÁTICAS ENDOCRINAS OBTENIDAS MEDIANTE DISPERSIÓN ENZIMÁTICA A PARTIR DE ISLOTES PRINCIPALES DE LUBINA (Dicentrarchus labrax)

M.P. García Hernández, A. González Sarrías, M.T. Lozano, M.T. Elbal, B. Agulleiro

Departamento de Biología Celular. Facultad de Biología. Universidad de Murcia. 30100 Murcia. España.

ABSTRACT. El método de dispersión celular tripsina/DNAasa permitió la obtención de 6.7×10^5 células/islote, con una viabilidad del 96.8%. El cultivo primario de las suspensiones celulares, en botellas no adherentes, dio lugar a la formación de agrupaciones celulares o seudoislotes. A lo largo del tiempo de incubación, se observó un incremento estadísticamente significativo en el tamaño de los seudoislotes y una evolución en su forma, desde agrupaciones celulares en hilera e irregulares, más frecuentes a los 7 días de cultivo, hacia seudoislotes ovoideos más macizos. La distribución de los tipos celulares pancreáticos endocrinos de lubina en los seudoislotes, salvo en los de menor tamaño, es similar a la de los islotes secundarios tipo I nativos, previamente descritos

INTRODUCCIÓN

La formación y conservación de la estructura de los islotes, importante para el correcto desempeño de su función, están sujetas a procesos de reconocimiento y adhesión entre las células y entre las células y el medio extracelular (1, 2). En mamíferos, se ha demostrado que las células aisladas a partir de islotes pancreáticos adultos son capaces de reagregarse *in vitro*, formando seudoislotes o agrupaciones celulares con distribución celular similar a los islotes nativos y capaces de secretar insulina en respuesta a glucosa (3, 4). En el presente trabajo se pretende desarrollar un sistema de agregación *in vitro* para obtener seudoislotes a partir de células endocrinas pancreáticas de islotes principales de lubina, que posibilite el estudio de los factores que median los procesos implicados en la morfogénesis y el mantenimiento de la estructura de los islotes de este teleósteo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lubinas adultas de ambos sexos, con un peso de 200-750 g, proporcionadas por el Centro Oceanográfico de Murcia en Mazarrón (IEO), fueron decapitadas y los islotes pancreáticos principales extraídos y troceados en medio de dispersión (Sales de Hank con 3,5 g/l de CINa, BSA al 0,3%, HEPES 10 mM, 100 unidades de penicilina y 100 mg de estreptomicina/l, HBSS). Los fragmentos se expusieron, sucesivamente, durante 50 min y 5 min, respectivamente, a soluciones de tripsina tipo II (Gibco, Invitrogen Lab.) (2.5 mg/ml HBSS) y de ADNasa (actividad tipo II, Sigma) (0.03 mg/ml HBSS) a 25°C; después de tratamientos sucesivos de 3 min con EDTA 2mM, 1mM y 0mM en HBSS libre de Ca $^{2+}$ /Mg $^{2+}$, se expusieron a ADNasa 0.03 mg/5 ml HBSS libre de Ca $^{2+}$ /Mg $^{2+}$ y las células se dispersaron mecánicamente y se transfirieron a un tubo de centrífuga a través de una malla de nylon de 65 μm. El filtrado se centrifugó 10 min a 1500 rpm. Tras el recuento, las células se ajustaron a una concentración de 4×10^5 células/ml en medio RPMI con los

suplementos del HBSS, glucosa 11 mM y suero bovino fetal al 10% y se incubaron en botellas no adherentes a 25°C, con atmósfera de $\rm CO_2$ del 5% y una humedad relativa del 85%. Tras 7, 14, 21 y 28 días de incubación, los seudoislotes se fotografiaron, se fijaron en paraformaldehido al 4% en tampón fosfato salino (PBS) y se procesaron para su estudio microscópico óptico. Se obtuvo el diámetro equivalente de 202 seudoislotes formados en los distintos periodos de incubación (MIP 4,5, Micron Image Processing Software, Consulting Image Digital Barcelona, España). Los datos fueron analizados mediante ANOVA seguido del test de Games-Howell.

Se aplicó la técnica peroxidasa-antiperoxidasa, con los anticuerpos que se detallan en la tabla I, a secciones de 4 μ m. La especificidad de la inmunotinción se determinó por omisión del primer antisuero. Como control positivo se utilizó páncreas de lubina adulta.

Tabla I. Antisueros primarios utilizados

Antisuero Contra	Fuente	Código	Dilución trabajo
In	Dr. Planas ¹	3p-6	1:5000
SST-25	Dra. Plisetskaya ²	3324	1:5000
SST-14	Incstar ³	566	1:500
Glu	Amersham⁴	RPN1602	1:500
PYY	Dra. Polak⁵	1710	1:1000
NPY	Dra. Polak⁵		1:500

In, insulina de bonito; SST-25, somatostatina 25 de salmón; SST-14, somatostatina 14 sintética; Glu, glucagón porcino; PYY, péptido tirosina-tirosina; NPY, neuropéptido tirosina; Barcelona, España; Seattle, USA; Stillwater, USA; London, UK.

RESULTADOS Y DISCUSSIÓN

Se obtuvieron 6,7x10⁵ células/islote principal de lubina, con una viabilidad del 96,8%. Tras la incubación de las suspensiones celulares en las condiciones referidas, se observó la formación de agrupaciones celulares o seudoislotes. muy heterogéneos en relación al tamaño. Se establecieron 4 rangos de tamaño: 1) por debajo de 16,5 µm de diámetro equivalente (DE), tamaño mínimo que alcanzan los grupos después de 14 días de incubación; 2) entre el límite anterior y 40,0 μm DE; 3) entre 40,1 μm DE, tamaño mínimo de los grupos a los 21 días, y 110,0 μm DE, tamaño máximo de los grupos a los 7 días; 4) entre el límite anterior y 275,4 µm DE, tamaño máximo alcanzado por los grupos, y se estableció la frecuencia relativa de los seudoislotes con tamaños comprendidos en los distintos rangos en cada periodo de incubación. Tras 7 días de incubación, los seudoislotes mostraban tamaños incluidos en los rangos 1, 2 y 3, siendo los más frecuentes los de rango 2. Tras 14 días de incubación, el tamaño de los seudoislotes comprendía los rangos 2, 3 y 4, disminuyendo la frecuencia de seudoislotes de rango 2 y aumentando la de los de rango 3. Después de 21 y 28 días de incubación, el tamaño de los seudoislotes incluía los rangos 3 y 4, siendo a los 21 días los de rango

3 más frecuentes que los de rango 4, mientras que tras 28 días en cultivo ambas frecuencias se igualaron. En cuanto a la forma de los seudoislotes, las cordonales e irregulares, más frecuentes a los 7 días de cultivo, evolucionaron hacia formas ovoideas más macizas. Algunas formas irregulares encontradas en periodos mas largos de incubación parecen originarse por coalescencia de grupos ovoides macizos. Así, en la lubina, la evolución de los agregados formados mediante cultivo primario de células pancreáticas endocrinas

aisladas es similar a la descrita en rata: 1) formación de cadenas celulares, 2) reorganización de las cadenas en pequeños esferoides y 3) crecimiento de los esferoides (4).

Los seudoislotes de rata presentan una distribución celular similar a los islotes nativos (3, 4). En lubina, salvo en los seudoislotes pequeños (rangos 1 y 2), la distribución celular es similar a la de los islotes secundarios tipo I nativos previamente descritos (5, 6): las células de insulina y las de somatostatina (SST)-14 aparecen en el interior del islote, rodeadas por células de SST-25 y de una capa periférica de células de glucagón, apareciendo escasas células de glucagón y péptido(s) de la familia del neuropéptido Y aisladas en la periferia.

Agradecimientos

Trabajo subvencionado por la Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (Proyecto PB/02/FS/02) y realizado en colaboración con el Centro Oceanográfico de Murcia (IEO), que ha proporcionado los peces. Agradecemos la asistencia técnica del Servicio de Análisis de Imagen de la Universidad de Murcia.

- Rouiller DG, Cirulli V, Halban PA 1991 Uvomorulin mediates calciumdependent aggregation of islet cells, whereas calcium-independent cell adhesion molecules distinguish between islet cell types. *Dev. Biol.* 148:233-242
- Cirulli V, Baetens D, Rutishauser U, Halban PA, Orci L, Rouiller DG 1994 Expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) in rat islets and its role in islet cell type segregation. *J. Cell Sci.* 107:1429-1436
- Halban PA, Powers SL, George KL, Bonner-Weir S 1987 Spontaneous reassociation of dispersed adult rat pancreatic islet cells into aggregates with three-dimensional architecture typical of native islets. *Diabetes* 36:783-790
- Matta SG, Wobken JD, Williams FG, Bauer GE 1994 Pancreatic islet cell reaggregation systems: efficiency of cell reassociation and endocrine cell topography of rat islet-like aggregates. *Pancreas* 9:439-449
- Lozano MT, García Ayala A, Abad ME, Agulleiro B 1991a Pancreatic endocrine cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) I. Immunocytochemical characterization of glucagon- and PP-related peptides. *Gen. Comp. Endocrinol.* 81:187-197
- Lozano MT, García Ayala A, Abad ME, Agulleiro B 1991b Pancreatic endocrine cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) II. Immunocytochemical study of insulin and somatostatin peptides. *Gen. Comp. Endocrinol.* 81:198-206

EVOLUTION OF PEPTIDES OF THE SECRETIN FAMILY IN VERTEBRATES

F. Vieira, J. Cardoso and D.M. Power

Centre of Marine Sciences, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal.

ABSTRACT. The secretin family of bioactive peptides is one of the largest families of brain-gut peptides in vertebrates. This family of peptides is suggested to have arisen during chordate evolution from a common ancestral gene as a consequence of gene or genome duplication. In mammals the physiological role of these hormones has been extensively studied however in other vertebrates such as teleost fish very little is known about their evolution or function since only a few peptide genes of the secretin family have been isolated. In the present work we have studied the evolution and putative physiological role of two closely related peptide encoding genes, VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) and PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide) in teleost fish.

INTRODUCTION

The VIP and PACAP peptides are members of the secretin family of which there are nine members in human. The protein products of these genes have important physiological functions in the mammalian nervous and gastrointestinal systems. Their sequence similarity has been taken to infer they evolved from a common ancestral gene as a consequence of gene or genome duplication events during metazoan evolution (1). An ancestral gene precursor of PACAP was isolated from the tunicate genome (Sherwood et al., 2000) and comparative analysis with the vertebrate orthologue genes revealed sequence conservation during evolution which is suggested to be a consequence of its important physiological role. The majority of the studies concerning these peptide genes have been conducted in mammals where the physiological role of these peptide hormones has been extensively studied. Relatively few studies of PACAP exist in teleost fish and the existence of a VIP gene precursor still remains to be established however its protein product is present in fish pituitary gland (2). The main objective of this study was to characterise VIP and PACAP genes in order to better understand the evolution and role of these peptides in teleosts.

METHODS

Isolation of PACAP and VIP genes in teleost fish

Identification of the teleost VIP and PACAP peptides was carried out by sequence similarity searches and by PCR and RACE techniques with sea bream cDNAs. Sequence similarity searches were performed using the Human and teleost PACAP and VIP genes and the genomes of the teleost, *Takifugu* (http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk), *Tetraodon* (http://www. genoscope.cns.fr) and zebrafish (http://www.sanger.ac.uk) and the EST databases of the medaka (http://mbase.bioweb.ne.jp) and Atlantic salmon (http://web.uvic.ca/cbr/grasp/) were searched using the BLAST algorithm. Isolation of sea bream PACAP and VIP cDNA were carried out by PCR and RACE on brain, testis and duodenum using degenerate primers. PCR amplification was carried out using the following cycle: 95°C for 2 minutes; [95°C for 1 minute, 57°C for 1 minute, 72°C

for 1 minute] (x35) and 72°C for 10 minutes. RACE was carried out using the SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech).

Sequence comparison and Expression studies

Multiple sequence alignments were carried out using vertebrate and invertebrate genes using the ClustaX programme and phylogenetic trees were constructed using the neighbour joining method and displayed with the Treeview tool. Tissue distribution was carried out by RT-PCR on several sea bream tissues (gills, kidney, liver, spleen, ovary, testis, brain, duodenum and heart) with specific primers and the following cycle: 95°C for 2 minutes, [95°C for 1 minute, 57°C for 1 minute x and 72°C for 1 minute] (x 35) and 72°C for 10 minutes.

RESULTS

Several teleost PACAP and VIP peptide genes were identified and characterised for the first time by searching EST databases using the human VIP and PACAP sequences. Duplicate PACAP genes were only identified in the Takifugu and Tetraodon genomes and a single VIP precursor gene was isolated in all other teleost fish analysed. Phylogenetic analysis carried out with all gene sequences from vertebrates and invertebrates suggests that these two peptides diverged from a common ancestor by gene duplication (Fig. 1). Sequence analysis revealed that PACAP and VIP peptide shares high sequence similarity in all the species analysed, including the tunicate PACAP gene precursors. This conservation also extends to gene structure and organisation which is similar amongst all non-mammalian species (data not shown). The teleost PACAP gene precursor also encodes the GHRH (Growth Hormone Releasing Hormone) gene while in the human and other mammals the GHRH gene is replaced by PRP (PACAP related peptide) gene. The gene structure of the VIP genes also differs between teleosts and humans and in the latter species the VIP precursor gene also encodes PHM (Peptide Histidine Methionine) unlike teleosts in which this gene is replaced by the PHI (Peptide Histidine Isoleucine). So far, neither PHM nor PHI have been identified in nonvertebrate species. Expression analysis in sea bream revealed that PACAP is mainly expressed in brain, ovary and testis while VIP has a more widespread distribution and is expressed in duodenum being also present in kidney, liver, testis and heart.

DISCUSSION

In the present study, VIP and PACAP genes were identified and characterised in several teleost fish using sequence database searches and PCR amplification. Phylogenetic analysis using all the vertebrate and invertebrate VIP and PACAP peptide precursor genes present in the database (Genebank) suggests that these genes arose from a common ancestral gene by gene duplication and that the duplicated PACAP gene precursors identified in *Takifugu* and *Tetraodon* genomes may be a result of a specific gene duplication in this species. The PACAP gene organisation is highly conserved between Humans and fish. In contrast, VIP gene structure in fish has one exon (exon 3) less than in to Human. Tissue expression revealed that teleost VIP and PACAP are mainly expressed in the brain, gonads and gut and like the mammalian orthologue genes they may have important functions on teleost nervous, gastrointestinal and reproductive systems.

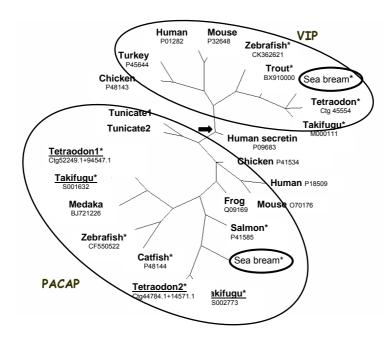


Figure 1. Phylogenetic analysis of the vertebrate and invertebrate VIP and PACAP peptide. The teleost gene sequences identified during this work are annotated with a star (*). Human secretin sequence was used as outgroup and the arrow indicates the common ancestral origin.

Acknowledgments

This work was financed by a CCMAR pluriannual fellowship. João Cardoso is in receipt a FCT fellowship (POCTI/SFRH/BDP/14449/03) from the Portuguese Ministry of Science.

REFERENCES

- Power, DM, Ingleton, PM 1998 Distribution of Vasoactive Intestinal Peptide in the brain and hypothalamo-hypophysial system of the sea bream (Sparus auratus). Trends in Comparative Endocrinology and Neurology 839:356-357.
- 2. Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE 2000 The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily. Endocr Rev 21:619-67

ANÁLISIS DEL SISTEMA GHRELINA/RECEPTOR DE SECRETAGOGOS DE GH (GHS-R) EN SOMATOTROPAS PORCINAS

F. Rodríguez-Pacheco¹, M.D. Culler², S. Klussmann³, S. García-Navarro¹, J.P. Castaño¹, M.M. Malagón¹

¹Dpto. Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Universidad de Córdoba, España. ²IPSEN, Millford, MA, USA. ³NOXXON Pharma AG, Berlin, Germany.

RESUMEN. El desarrollo de compuestos sintéticos capaces de estimular la secreción de hormona del crecimiento (GH) o GHSs por las células somatotropas hipofisarias, incluso antes de la identificación del principal factor estimulador hipotalámico de GH (GHRH), condujo dos décadas después al descubrimiento de un sistema endógeno ligando-receptor básico en la regulación de la secreción de GH. Así, la ghrelina, un péptido de reciente identificación expresado en diversos tejidos, incluida la hipófisis, estimula la secreción de GH por las somatotropas a través del receptor de GHS o GHS-R. Es más, como indica nuestro estudio, el sistema ghrelina/GHS-R interacciona también con la GHRH y su receptor (GHRH-R), siendo esencial para su funcionamiento.

INTRODUCCIÓN

Desde la identificación a principios de los 80 de derivados peptídicos de la Met-encefalina con capacidad para liberar GH, se han sintetizado una gran variedad de compuestos, tanto peptídicos (GHRP) como no peptídicos que, en conjunto, reciben el nombre de secretagogos de GH (GHS) (1). Los GHSs ejercen su acción mediante su unión a un receptor específico de la familia de receptores con 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G (GHS-R), del que se han identificado dos isoformas, una funcional (GHS-R1a) que codifica el receptor completo y una isoforma truncada en el tercer dominio intracelular o GHS-R1b, originada por splicing alternativo (1).

Tres años después de la caracterización del GHS-R se identificó su ligando endógeno, la ghrelina, aislada originalmente a partir de estómago de rata pero que también se expresa en hipotálamo y en hipófisis (2). La ghrelina estimula la secreción de GH en todas las especies estudiadas (2), incluida la porcina, en la que este péptido muestra *in vitro* una eficacia similar a la ejercida por una concentración equimolar de GHRH (3). Más aún, en cultivos de células adenohipofisarias porcinas tanto la ghrelina como la GHRH regulan la expresión de sus propios receptores, GHS-R y GHRH-R, ejerciendo además una regulación heteróloga de los receptores respectivos (4). Existe por tanto una interacción entre los sistemas ghrelina/GHS-R y GHRH/GHRH-R a nivel de la somatotropa. En este sentido, recientemente se ha descrito que la secreción de GH inducida por GHRH en somatotropas de rata es inhibida si se bloquea el GHS-R 1a con un antagonista específico (5).

Para determinar la contribución específica de los sistemas ghrelina/GHS-R y GHRH/GHRH-R a la respuesta secretora de las somatotropas, en el presente estudio hemos evaluado la secreción de GH en cultivos de células adenohipofisarias porcinas tratadas con agonistas sintéticos de ghrelina y de GHRP, así como con un antagonista específico del GHS-R1a. Además, estudiamos la participación de la ghrelina en la respuesta de las somatotropas a GHRH mediante el uso de un enantiómero molecular de la misma, el RNA-

Spiegelmer NOX-B11, el cual, uniéndose a la ghrelina, bloquea su efecto estimulador sobre la secreción de GH de rata *in vivo* (6).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron cerdas prepúberes (4-6 meses) de raza Large White/Landrance. Tras su extracción, las adenohipófisis se sometieron a una dispersión enzimático-mecánica para obtener una suspensión de células monodispersas (3). Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (3x10⁵ células/pocillo/ ml MEM). Tras tres días en cultivo (37°C; 5%:95% CO₂:aire), realizamos los siguientes tratamientos (30 min): 1) dosis-respuesta (10⁻⁶-10⁻¹⁴ M) con dos agonistas de ghrelina (BIM-28125, BIM-28167) y un agonista de GHRP (BIM-28131); 2) tratamiento con 10⁻⁸ M GHRH, ghrelina o el GHS peptídico GHRP-6 en ausencia o presencia del antagonista específico de GHS-R1a, BIM-28163 (10⁻⁸ M); y 3) tratamiento con 10⁻⁸ M GHRH o ghrelina en ausencia o presencia de NOX-B11 (3x10⁻⁸M). Tras los tratamientos, la cantidad de GH secretada en el medio de cultivo se evaluó mediante un inmunoensayo específico (3).

RESULTADOS

El análisis de la dosis-respuesta a los agonistas de ghrelina BIM-28125 y BIM-28167 y al agonista de GHRP, BIM-28131, mostró que éste último presenta un mayor eficacia para estimular la secreción de GH en cultivos de células adenohipofisarias porcinas. Así, mientras que BIM-28131 ejerce un efecto estimulador máximo ya a una concentración 10⁻¹⁴ M, se requieren dosis mayores de los agonistas de ghrelina (10⁻¹⁰ M, BIM-28167; 10⁻⁸ M, BIM-28125) para estimular significativamente la secreción de GH. Por su parte, el antagonista específico del GHS-R1a BIM-28163, bloqueó el efecto estimulador de la ghrelina (10⁻⁸M) sobre la secreción de GH a dosis muy bajas (10⁻¹²M). De forma similar, BIM-28163 también inhibe el efecto estimulador inducido por GHRP-6, así como la secreción de GH estimulada por el factor hipotalámico primario de las somatotropas, GHRH, tanto cuando éste se administra solo como en combinación con ghrelina.

Para investigar la contribución de la ghrelina endógena a la acción de la GHRH, los cultivos se trataron con el enantiómero molecular de ghrelina NOX-B11. En primer lugar, confirmamos que dicha molécula es capaz de bloquear la ghrelina ya que la adición de ghrelina 10⁻⁸ M a los cultivos en presencia de NOX-B11 no indujo el efecto estimulador observado en ausencia de este compuesto. Más aún, NOX-B11 también bloqueó el efecto estimulador inducido por GHRH, tanto solo como combinado con ghrelina.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos tras el tratamiento de las somatotropas en cultivo con un antagonista específico de la isoforma 1a del GHS-R, BIM-28163, demuestran, por primera vez en la especie porcina, que este receptor es necesario para que la ghrelina estimule la secreción de GH. Dicho receptor también parece ser fundamental para la acción de otros ligandos del GHS-R, como el GHS peptídico GHRP-6, que también estimula la secreción de GH en la especie porcina *in vitro* (7), por lo que, en conjunto, estos datos indican que GHS-R1a es el principal receptor que media el efecto de ghrelina/GHSs sobre este tipo celular. Curiosamente, nuestros datos también muestran que dicha isoforma debe ser funcional para que la GHRH ejerza su efecto sobre este tipo celular, ya que la presencia del antagonista bloquea la secreción de GH inducida por dicho factor hipotalámico. Por el contrario, en el caso de la rata, BIM-28163 no afecta la acción de GHRH sobre la liberación de GH *in vivo* (8).

lo que podría sugerir la existencia de diferencias interespecíficas en cuanto al mecanismo de acción de GHRH. No obstante, estudios con células hipofisarias de rata en cultivo sí han mostrado que la presencia del inhibidor de GHS-R [D-Lys-3]-GHRP-6 disminuye de manera significativa la liberación de GH mediada por GHRH (5). Por tanto, al menos *in vitro*, parece que sí es necesaria la activación del GHS-R1a hipofisario para que GHRH actúe sobre las somatotropas. Nuestros datos muestran también que, además del GHS-R1a, es necesaria la presencia de la propia ghrelina para que GHRH actúe sobre las somatotropas. Así, la presencia del enantiómero de ghrelina NOX-B11 inhibió no sólo el efecto de la ghrelina añadida al medio de cultivo, lo cual confirma la eficacia del compuesto para unir y bloquear ghrelina (6), sino también el de GHRH.

En conjunto, nuestros datos indican que la ghrelina ejerce su acción estimuladora sobre las somatotropas porcinas a través del GHS-R1a. Además, ponen de manifiesto que la desactivación de dicho receptor y/o la ausencia de ghrelina en el medio bloquea la actividad de GHRH, lo que sugiere que la integridad funcional del sistema ghrelina/GHS-R hipofisario es fundamental para que GHRH ejerza su efecto estimulador sobre la secreción de GH.

Agradecimientos

Financiación: CVI-139 (J. Andalucía) BFI 2001-2007 y BFI 2000-0872 (MEC).

- Smith RG 2005 Development of growth hormone secretagogues. Endocr Rev 26:346-360.
- Kojima M, Kangawa K 2005 Ghrelin: structure and function. Physiol Rev 85:495-522
- 3. Malagón MM, Luque RM, Ruiz-Guerrero E, Rodriguez-Pacheco F, Garcia-Navarro S, Casanueva FF, Gracia-Navarro F, Castaño JP 2003 Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. *Endocrinology* 144:5372-5380.
- Luque RM, Kineman RD, Park S, Peng XD, Gracia-Navarro F, Castaño JP, Malagón MM 2004 Homologous and heterologous regulation of pituitary receptors for ghrelin and growth hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 145:3182-3189.
- Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Tatsuguchi A, Sugihara H, Oikawa S, Kineman RD 2004 The role of pituitary ghrelin in growth hormone (GH) secretion: GH-releasing hormone-dependent regulation of pituitary ghrelin gene expression and peptide content. *Endocrinology* 145:3731-3738.
- Helmling S, Maasch C, Eulberg D, Buchner K, Schroder W, Lange C, Vonhoff S, Wlotzka B, Tschop MH, Rosewicz S, Klussmann S 2004 Inhibition of ghrelin action in vitro and in vivo by an RNA-Spiegelmer. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:13174-13179.
- Sanchez-Hormigo A, Castaño JP, Torronteras R, Malagon MM, Ramirez JL, Gracia-Navarro F 1998 Direct effects of growth hormone (GH)-releasing hexapeptide (GHRP-6) and GH-releasing factor (GRF) on GH secretion from cultured porcine somatotropes. *Life Sci* 63:2079-2088.
- 8. Halem HA, Taylor JE, Dong JZ, Shen Y, Datta R, Abizaid A, Diano S, Horvath T, Zizzari P, Bluet-Pajot MT, Epelbaum J, Culler MD 2004 Novel analogs of ghrelin: physiological and clinical implications. *Eur J Endocrinol* 151:S071–S205.

ROLE OF IGF-II IN THE PI3K/Akt AND MAPK SIGNALLING PATHWAYS IN RAINBOW TROUT (Oncorhynchus mykiss)

M. Codina¹, D. García de la Serrana¹, O. Chistyakova², N. Montserrat¹, I. Navarro¹, J. Gutiérrez¹

¹ Dept. de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, España.

² Sechenov Institute, RAS, Saint Petersburg, Russia.

ABSTRACT. Primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle cells at different stages of development have been used to assess the role of IGF-II in the activation of the two main signalling pathways in muscle from the IGF-I receptor. Western Blot assays have allowed us to determine the levels of phosphorylated and non-phosphorylated MAPK and Akt after the treatment of cells with piscine and mammalian peptides. The inhibitory action of two compounds was also tested.

INTRODUCTION

Insulin-like growth factors (IGFs) have many functions (both metabolic and mitogenic) in several tissues (4). In fish, as in mammals, muscle is a target tissue for these factors. Recent reports describe the effect of insulin and IGF-I on cell proliferation and glucose and alanine uptake in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) muscle cells in culture (2). Their effects on the main signalling pathways through the insulin and IGF-I receptors in muscle have also been reported (Castillo et al., submitted).

The MAPK pathway is involved in cell proliferation and its activation induces mechanismes of cell division. In addition, the PI3K/Akt pathway is more related to metabolic pathways and also cell survival and differentiation (3).

Here we compared the role of IGF-II (in comparison to IGF-I) in the activation of key molecules of the two intracellular signalling pathways in the muscle, using primary cultures of rainbow trout muscle cells at different stages of development. We also compared the effects of peptides of different origins (trout, tuna or human), and studied the effect of specific inhibitors of the phosphorylation of MAPK an Akt.

MATERIAL AND METHODS

Animals and cell culture. White muscle was taken from rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) with an aproximate weigh of 3-8g. After a mechanical dissociation of the tissue, enzymatic digestion was carried out by incubating the cells with collagenase and trypsin. After a series of washes and filtrations, cells were counted and viewed on culture plates pre-treated with laminin and kept in culture at 18°C with DMEM 10%FBS until the experiment. The medium was changed daily (1).

Western Blot. 1, 5, 8 or 11 days after the isolation and culture of the cells, the culture medium was aspirated and replaced by DMEM 0.5%BSA for 2-3h. After this time, cells were incubated with IGF-I or IGF-II 100nM for 30min. For the experiments with inhibitors, cells where incubated with wortmanin (1μM) or PD98059 (50μM) for 30min before the treatment with IGF-II. Subsequently, medium was aspirated and cells were washed in cold PBS and lysed with a lysis buffer. Electrophoresis in a polyacrylamide gel was performed in the presence of SDS. Samples were then transferred to a PVDF membrane for 90min at a constant current of 1A in a transfer buffer. After washing, the

membrane was incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (Cell Signalling rabbit anti-Akt and mouse anti-AktP, anti-MAPK and anti-MAPKP). The membrane was then washed and incubated for 1h at room temperature with the corresponding secondary antibody. Immunoreactive bands were visualized by ECL, and quantified with an image analyzer (TotalLab v1.00), considering 100% as the basal level.

RESULTS

Effects of trout IGF-I and tuna IGF-II at different stages of development. We did not find differences on MAPK level between control and treated cells but it decreased as the cells differentiated. IGF-I and IGF-II were able to stimulate the phosphorylation of MAPK to the same extent, with the highest activation at day 5 (Fig.1A). There were no differences in Akt levels between control and stimulated cells or at different phases of culture. In contrast, on day 5 and especially on day 11 there was a high effect of IGFs in stimulating this pathway (Fig.1B).

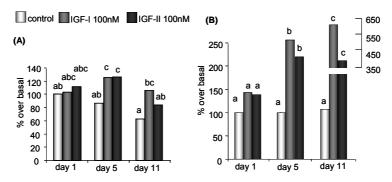


Figure 1. Western Blot for (A) MAPK-P and (B) Akt-P in cell lysates from primary cultures of rainbow trout muscle cells at day 1, 5 or 11 of development. Results given as mean values and statistics was done by one factor ANOVA.

Comparison between fish and mammalian IGFs. The levels of non-phosphorylated forms were not affected by IGF-I or IGF-II. The exception was Akt on day 8 when cells were treated with trout IGF-I (130% over basal) or human IGF-I (150% over basal). Meanwhile, MAPK-P was stimulated on day 1 by both IGF-I and IGF-II to a similar extent (increases from 130 to 200%, with greater effect of fish peptides) and by IGF-I on day 8 (maximum increases of 250% over basal). The two IGFs also activated the Akt-P form but only on day 8 (increases of 180-200% for IGF-I and 110-150 for IGF-II).

Effect of wortmannin and PD98059 on the activation of the MAPK and the Akt. Incubation with PD98059 (specific inhibitor for MAPK) caused a significant decrease in the levels of the phosphorylated form of MAPK both in control and in IGF-II treated cells. Inhibition was maximum on day 1 when cells stimulated with the peptide. Wortmannin showed no change in the activation of this molecule (Fig. 2A). Looking to the Akt levels, it is seen that neither wortmannin nor PD98059 affected, but the treatment with wortmannin leaded to a significant inhibition of the Akt-P form in cells treated with IGF-II on both day 1 and day 8 (Fig. 2B).

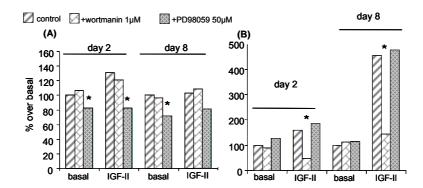


Figure 2. Western Blot for (A) MAPK-P and (B) Akt-P in cell lysates from primary cultures of rainbow trout muscle cells at different development stages, stimulated by IGF-II 100nM and incubated with specific inhibitors.

DISCUSSION

In vertebrates, the PI3K/Akt and MAPK pathways are the main signaling pathways for IGF-I and insulin (7). Here we report that the IGFs stimulate the MAPK pathway more strongly in the early stages of development, whereas their effects on the PI3K/Akt pathway increase as the culture progresses. This is consistent with the theory that the two pathways exert opposite effects in muscle, and depending on the differentiation stage of the cells, one or the other pathway is activated (6).

In some cases, the effect of IGF-II is slightly lower than the effect of IGF-I. It can be explained by the fact that IGF-II can act through the IGF-IR, as seen in primary cultures of rat muscle cells (5), but it also interacts with its own receptor, which is thought to be implicated in peptide degradation.

Peptides of different origin (fish or mammal) show similar capacity to stimulate Akt-P and MAPK-P, which is consistent with the high conservation of these molecules throughout the evolution (8).

Finally, the specificity of the molecules studied has been demonstrated by the use of inhibitors (PD98059 and wortmannin) that decrease the phosphorylation of MAPK and Akt respectively.

In summary, it has been demonstrated that, in cultured muscle cells, IGF-II exerts similar effects to IGF-I on the MAPK and the PI3K/Akt pathways, and these effects depend on the development stage of the myocytes.

Acknowledgements

AGL046319, 2005FI00520 and SGR122.

REFERENCES

- 1. Castillo J, Le Bail PY, Paboeuf G, Navarro I, Weil C, Fauconneau B, Gutierrez J. (2002) Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. (2002) 283(3):R647-52.
- 2. Castillo J, Codina M, Martínez ML, Navarro I, Gutiérrez J. (2004) Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004 May;286(5):R935-41
- 3. Coolican SA, Samuel DS, Ewton DZ, McWade FJ, Florini JR. (1997) J Biol Chem 272:6653-62

- 4. Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. (1996) Endocrine reviews. 17(5);481-
- 5. Galvin CD, Hardiman O, Nolan CM. (2003) Mol Cell Endocrinol 200(1-2):19-29
- 6. Jones NC, Fedorov YV, Rosenthal RS, Olwin BB. (2001) J Cell Physiol 186:104-15
- 7. Le Roith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT. (1995) Endocrine reviews. 16(2):143-63
- 8. Shamblott MJ, Chen TT. (1992) Proc Natl Acad Sci USA 89:8913-8917

REGULATION OF LIPOPROTEIN LIPASE (LPL) ACTIVITY IN RAINBOW TROUT (Oncorhynchus mykiss) TISSUES: ROLE OF INSULIN

A. Albalat, L. Bouraoui, J. Sánchez-Gurmaches, J. Gutiérrez, I. Navarro

Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, España.

ABSTRACT. Four hours after the ingestion of food, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) showed increased LPL activity in adipose tissue and high plasma insulin levels. No clear changes were detected in red or white muscles. Moreover, fasting produced a down-regulation of LPL activity in adipose tissue, concomitant with low levels of plasma insulin. While insulin administration stimulated the activity of this enzyme in this tissue 3 hours after injection, no response was observed in red or white muscles. Finally, *in vitro* studies using fat pads revealed that insulin stimulated the proportion of LPL in active conformation at the extracellular level. These data indicate that LPL activity is regulated in a tissue-specific manner after food intake, and indicate that insulin regulates the activity of this enzyme in the adipose tissue of rainbow trout.

INTRODUCTION

Lipoprotein lipase (LPL) is located at the vascular endothelium and in LPL-synthesizing cell tissues (Olivecrona and Bengtsson-Olivecrona, 1987), where it hydrolyses triglycerides from circulating chylomicrons and very low density lipoproteins (VLDL). These triglycerides are hydrolysed into free fatty acids (FFA), which can then be re-esterified and stored, as occurs in adipose tissue, or used as an energy source by tissues, mainly in muscle and heart (Auwerx et al., 1992).

In mammals, adipose tissue LPL activity is down-regulated during fasting (Lladó et al., 1999) and increases after food intake, in tandem with a rise in plasma insulin (Eriksson et al., 2003), one of the main positive regulators of LPL (Farese et al., 1991). In fish, little is known about LPL activity and its nutritional or hormonal regulation. Black and Skinner (1986) reported that LPL activity decreased with fasting in adipose tissue and liver, but not in heart or red muscle in trout. However, the hormonal regulation underlying these effects remains to be elucidated. Here we examined the nutritional regulation and the role of insulin on LPL activity in rainbow trout.

MATERIAL AND METHODS

Post-feeding experiment. Rainbow trout (n = 20) with an average weight of 290 g were fed a commercial diet ad libitum. Fish were sampled 2, 4, 6, and 36 hours after feeding. 2. Fasting experiment. A group of fish with an average weight of 360 g (n=19) was deprived of food for 21 days and a control group was fed ad libitum. 3. In vivo injection of insulin: Rainbow trout (n = 22) with an average weight of 310 g received a single intraperitoneal injection (1 μ l/g body wt.) of vehicle (PBS) or porcine insulin (2.16 nmol/100 g body wt.), and were sampled after 3 and 6 hours.

In all the experiments, blood samples were taken, fish were weighed, and adipose tissue, red muscle and white muscle were rapidly extracted and frozen in liquid nitrogen.

In vitro experiments: Adipose tissue was cut into small pieces and 1 g samples were incubated in Krebbs buffer supplemented with BSA 4% (4 ml), with or without porcine insulin (500 nM) for 4 hours at 15°C in a shaking bath. The medium was then removed and fresh medium containing heparin was added. LPL was measured in heparin-containing buffer (heparin-releasable fraction, HR-LPL), and in heparin-washed adipose tissue pieces following homogenization (non-heparin-releasable fraction, NHR-LPL), as described by Ballart et al., (2003). Total LPL activity was calculated by adding the LPL values of these two fractions.

Lipoprotein lipase assay. From *in vivo* studies, homogenates of adipose tissue and red and white muscles from each fish were assayed following Bengtsson-Olivecrona and Olivecrona 1991, with slight modifications.

Biochemical analyses of plasmatic parameters. Plasma glucose concentration (glucose oxidase colorimetric method), FFA (NEFA-C, Wako Test) and insulin levels (by RIA), were measured.

RESULTS

Experiment 1: Plasma insulin levels were high and similar between 2 and 6 hours after feeding, decreasing to basal levels (2.56 \pm 0.74 ng/ml) at 36 hours. Maximum levels of glycemia occurred 4 hours after feeding. Plasma FFA levels were similar at the sampling times studied. LPL activity in adipose tissue began to increase 2 hours after feeding and peaked (978.87 \pm 24.35 mU/g) at 4 hours. Afterwards, activity decreased at 6 hours, reaching values close to basal levels. Although a similar pattern was observed in red muscle, the differences between sampling times were not significant. In white muscle, LPL activity was very low and the changes observed in activity were not significantly different.

Experiment 2: Fasting produced a considerable decrease in plasma insulin levels, from 18.34 ng/ml in fed fish to non-detectable levels in fasted ones. Fasting caused an almost 3-fold decrease in adipose tissue LPL activity (400.04 ± 35.03) in fed fish vs. 144.34 ± 14.55 mU/g tissue in fasted fish).

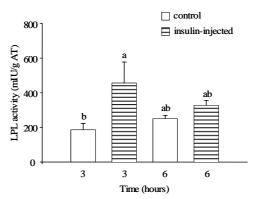


Figure 1. Insulin increased LPL activity in adipose tissue 3 hours after injection.

Experiment 3: Insulin increased LPL activity in adipose tissue 3 hours after injection (Fig. 1). In red muscle, LPL activity did not respond to insulin administration. In all experiments, adipose tissue exhibited the highest LPL activity in comparison with red and white muscles.

In vitro experiment: LPL activity was higher in the NHR-LPL than the HR-LPL fraction. Insulin stimulated the percentage of HR/Total LPL activity (Fig. 2). HR-LPL activity is thought to represent the active form of the enzyme found at the extracellular level. Moreover, insulin tended to lower NHR-LPL activity, which is believed to represent intracellular LPL in active conformation.

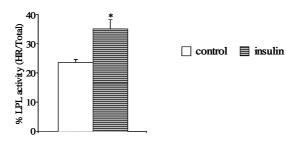


Figure 2. Insulin stimulated the percentage of HR/Total LPL activity in vitro.

DISCUSSION

The values of LPL activity indicate the capacity of trout tissues to take up triacylglycerol from circulating lipoproteins. The LPL activity of adipose tissue in this fish responded to feeding, in tandem with high insulin levels, which may trigger activation of the enzyme, as in mammals (Picard et al., 1999). However, other factors could contribute to the modulation of LPL activity during the post-prandial period. The absence of changes in red and white muscles is consistent with reports in mammals, in which muscle LPL activity decreases or is not altered after feeding (Picard et al., 1999; Lanza-Jacoby et al., 1997).

The down-regulation of LPL activity observed in adipose tissue under fasting supports the observation that metabolism of fish adipose tissue is directed to increase lipid mobilization (Albalat et al., 2005) and to inhibit lipid uptake, thereby allowing vital organs or tissues, such as red muscle and heart, to continue using lipids as an energy source to maintain their functions. The change in LPL activity in adipose tissue was accompanied by a clear decrease in plasma insulin levels, indicating that this hormone may also be involved in the down-regulation of the LPL in fasted fish. In mammals, however, LPL activity is also regulated by other hormones, such as glucagon, and therefore, other endocrine factors may also participate in the effects observed (Borensztajn et al., 1973).

Insulin administration induced hypoglycemia, confirming its effectiveness. Interestingly, while insulin increased LPL activity in adipose tissue 3 hours after injection, no effects were observed in red and white muscle. This observation confirms a tissue specific regulation of this hormone, as in mammals, in which insulin increases LPL activity in adipose tissue and decreases this activity in muscle (Farese et al., 1991).

The *in vitro* studies demonstrated the direct effects of insulin on LPL activity. This hormone increased the percentage of heparin-releasable LPL activity vs. total activity, which is in agreement with the results in cultured human tissue fragments, whereby insulin increased both HR-LPL activity and total LPL activity (Apple and Fried, 1992).

In summary, LPL activity in rainbow trout is regulated in a tissue-specific manner by nutritional condition. Changes in plasma insulin, together with the effect of this hormone *in vivo* and *in vitro*, indicate that insulin is a positive regulatory factor on LPL activity in adipose tissue.

Acknowledgements

Supported by AGL2004-06319-C02/ACU, (CRA)-2004 303038/ 2.2, SGR122 and by the European Union (Q5RS-2000-30068) PEPPA.

REFERENCES

- 1. Albalat et al., 2005. J. Endocrinol. 184: 527-534.
- 2. Apple and Fried, 1992. Am. J. Physiol. 262: E695-699
- 3. Auwerx et al., 1992. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 29 (3): 243-268.
- 4. Ballart et al., 2003. Biochimie 85: 971-982.
- 5. Bengtsson-Olivecrona and Olivecrona 1991 In Converse C, Skinner ER, (eds). *Lipoprotein analysis*. Oxford: Oxford University Press, 169-773.
- 6. Black and Skinner, 1986 J. Comp. Physiol. B 156: 497-502.
- 7. Borensztajn et al., 1973. Biochem. Biophys. Res. Commun. 53 (2): 603-608.
- 8. Eriksson et al., 2003. Atherosclerosis 166: 359-367
- 9. Farese et al., 1991. Metabolism 40: 214-216.
- 10. Lanza-Jacoby et al., 1997. J. Lipid Res. 38: 701-710.
- 11. Lladó et al., 1999. J. Nutr. Biochem. 10: 609-614.
- 12. Olivecrona and Bengtsson-Olivecrona, 1987. In: Borensztajn J (Ed.), Lipoprotein lipase. Evener Press, Chicago pp. 15-58
- 13. Picard et al., 1999 Diabetes 48: 452-459.

EXPRESSION OF MYOGENIC REGULATORY FACTORS AND MUSCULAR GENES IN RESPONSE TO ECTOPIC EXPRESSION OF IGF-I BY INTRAMUSCULAR DNA INJECTION IN ZEBRAFISH (Danio rerio)

M. Codina¹, C. Rallière², J.C. Gabillard², I. Navarro¹, J. Gutiérrez¹, P.Y. Rescan²

¹Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, España and ²Croissance et Qualité de la Chair des Poissons, SCRIBE-INRA, Rennes, France.

ABSTRACT. IGF-I was overexpressed in zebrafish myotomal muscle by injection of an IGF1 cDNA containing expression vector. Subsequent to the injection, the evolution of the expression of several myogenic regulatory factors (MRFs) and some contractile protein encoding genes was analysed by Northern Blot and RealTime-PCR.

INTRODUCTION

Several factors that are involved in the activation and proliferation of myogenic cells through a complex network of interactions have been identified in higher vertebrates. These factors include the IGF-I and IGF-II (1), the FGF family (4) and myostatin, a member of the TGF family (2).

During muscle cell proliferation and differentiation, there is sequential activation of several skeletal muscle transcription factors like myf5, MyoD, myogenin and mrf4, which play distinct roles in the control of myogenesis (6;7). The homologues of these proteins have been found in many fish species, like trout, zebrafish and carp, but the effects of IGFs on these factors remain to be established. The expression pattern of several genes encoding for contractile proteins with roles at different stages of development is also interesting.

To assess the myogenic activity of IGFs, especially IGF-I, we tested a method to obtain ectopic expression of IGF-I in adult zebrafish (*Danio rerio*) myotomal muscle using an expression vector (pCMV) containing the cDNA for IGF-I or lacZ (control) (5). The vector was injected into the muscle, and the evolution of the expression of MRFs and several genes encoding contractile proteins was monitored by Northern Blot and RT-PCR.

MATERIAL AND METHODS

Intramuscular DNA injection. Four-month-old zebrafish (Danio rerio) were kept in an indoor tank under environmental temperature (25°C) and natural photoperiod and fed twice a day with a commercial diet until the injection of the vector. Fish were rapidly anaesthetized with phenoxy-ethanol and placed under a loupe. The animals were then injected with 50µl of solution containing the copolymer PE-6400 and the plasmid pCMV with lacZ (n=16) or IGF-l (n=12), and returned to the water. To assess the success of the injection, seven days after injection of pCMV- β gal plasmid, some fish were killed and muscle transversal sections were fixed in 4% paraformaldehyde for 20min. After washing with PBS, muscle was incubated in X-gal solution overnight at room temperature and protected from the light.

Muscle sampling. At day 3 or 8 post-injection, fish were killed by decapitation and the viscera and tail were removed. Whole muscle was taken for RNA extraction. RNA was purified using TRIzol, a method based on the technique of

Chomczynski (1987), and stocked at –80°C until analysis. RNA was quantified on the basis of absorbance at 260nm and qualified by the ratio 28S/18S. *Study of the expression of MRFs and contractile proteins genes.* Two approaches were followed. First, Northern Blot analyses were performed for several genes using radiolabeled probes (specific cDNA probes for zebrafish MyoD, myogenin, myostatin, myf5, mrf4, desmin, and myosin light chain 3 (myL3) among others). Second, specific primers (see Table 1) were designed for some of these genes in order to perform Real-Time RT-PCR.

Table 1. Nucleotide sequences of the PCR primers used to assay gene expression by Real-Time RT-PCR.

	primer forward	primer reverse
myoD	catta cagtg gag actctga t	ctgtcatagctgttccgtct
myogenin	ggt cagtt cactcaa cca gc	tgccag agccctg atcacta
myostatin	a agag gacg atga acatg cca	tgaa gga gaa aaa gcaaca ctt
IGF1	cg actctg gag gcggg g	ttg aact aggt ccatat cd g
myf4	cccg ccagtccctcct cca gc	tt ttgt gcgtca aag ttgt agcta tt
mrf4	cagg aga acccaga tcattcca g	ga gagg cgacg aaga ctgctg g
FGF6	gg aag gata aacg gag tccataa t	g ctgctcattgcgacaaacacc
desmin	agtcca ctccaag aaa acagtcd g	t gttt ctcaag cttta ca tga cgtc
CMV	tag gcgtg tacgg tgg gagg t	gtg tcttcta tgga ggt caaaa ca
prom. CMV	aa accag aaa gtta actgg tcccg	g tga gag ggtg tggg tactcg g

RESULTS

The histochemical detection of β -gal showed that the injection of the plasmid into the muscle of zebrafish was successful, although there was great variation between muscle area and between fish.

The signal obtained by Northern Blot was very weak and it was only possible to determine the amount of myL3 mRNA. On day 8 the response to the injection of the plasmid was higher (41% increase at day 3 and 57% at day 8). Also, basal myL3 levels were higher on day 8 (237±25.7a.u.) than on day 3 (116±17.2a.u.).

RT-PCR technique gave better results, but there was high variation between animals. mRNA levels for myogenin, myostatin, myoD and desmin were measured and, although expression in fish injected with the plasmid containing IGF1 was higher on day 3, it is difficult to establish a clear correlation between the plasmid injection and this increase (see individual and mean values in Table 2).

mRNA levels of IGF-I were also determined first using a specific primer for the plasmid CMV-IGF1 and then pre-incubating samples with DNase. Results demonstrated that fish injected with pCMV-IGF1 had incorporated the plasmid into the cells (Figure 1A), although the amount of plasmid decreased significantly on day 8. The incubation with DNase (Figure 1B) shows overexpression of IGF-I only on day 3, but lower than expected and with high variability.

Table 2. Individual and mean values of mRNA levels determined by RT-PCR of myoD, myogenin, myostatin and desmin.

	treatment	Мус	D	¦ Myog	enin	Myos	tatin	Desn	nin
day 3	CMV-lacZ	16,7	4,93	13,6	4,37	5,2	2,7	8,67	2,8
		16,1	18,2	9,34	7,74	2,96	5,8	8,19	18
		9,4	10,6	8,03	4,67	7,4	5,2	11	12,4
	mean ± s.e.	12,65±	2,11	7,95±	1,38	4,88±	0,73	10,18±	2,06
	CMV-IGF1	22,6	18,9	12,4	8,08	4,14	2,97	13,8	4,86
		8,8	14,1	8,24	10,1	5,22	7,16	12,4	8,78
		12,7		10,8		7,64		14,3	
	mean ± s.e.	15,42±	1,12	9,92±	0,81	5,426±	0,88	10,83±	:1,78
day 8	CMV-lacZ	9,7	9,64	10,7	20,1	6,2	5,3	5,54	9,85
		7,69	17	10,3	16,8	3,59	4,56	7,14	9,99
		12	12,4	15,6	9,36	6,64	5,52	9,68	7,85
		10,6		10,2		5,26		6,25	
	mean ± s.e.	11,29±	:0,38	13,29±	4,18	5,29±	0,38	8,04±	:0,69
	CMV-IGF1	6,06	4,03	6,58	4,14	5,45	3,97	3,23	4,15
		4,06	4,18	9,97	11,5	3,75	4,1	4,33	5,75
		4,33		7,99		3,75		4,91	
	mean ± s.e.	4,53:	±0,86	8,03	±2,87	4,20±	:0,32	4,47±	0,93

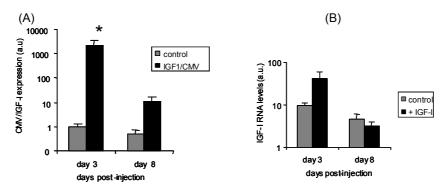


Figure 1. mRNA levels of (A) the vector CMV containing the IGF1 cDNA and (B) the IGF-I from the injection of the vector after incubating the samples with DNase. Results are given as mean \pm s.e. (n=5-7), with p<0.05

DISCUSSION

Our results indicate that RT-PCR is a more sensitive technique than Northern Blot for measuring the mRNA levels of the gens of interest and it permits the detection of lower concentrations of mRNA.

In the present study it has been demonstrated that IGF-I can be overexpressed following direct injection in the zebrafish myotomal muscle of a cDNA conjugated with a polymer, as described by Pitard et al. (5). However, the half life of the plasmid in the cells is short and the increase of IGF-I is lower than expected, which is inconvenient.

There was also high variability between animals. Both lacZ- and IGF1-injected fish showed different injection efficiency, as demonstrated by the β -gal activity observed and also by the determination of CMV/IGF-1 mRNA. The degree of IGF-I expression shown by different animals was also highly variable.

Nevertheless, it has been possible to detect differences in the levels of MyoD, myogenin and myostatin on day 3. This indicates a transitory effect of the overexpression of IGF-I that would lead to variations in MRFs levels. These preliminary results are promising and stimulate to progress with this research and to improve this scientific approach.

Acknowledgements

COST Action 925, SGR122, AGL046319 and 2005FI00569.

REFERENCES

- 1. Florini JR, Ewton DZ and Coolican SA. Endocr Rev. 1996;17(5):481-517.
- McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Nature. 1997;387(6628):83-90.
 McPherron AC, Lee SJ. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(23):12457-61.
- 4. Olwin BB, Hannon K, Kudla AJ. Prog Growth Factor Res. 1994;5(2):145-
- 5. Pitard B, Pollard H, Agbulut O, Lambert O, Vilquin JT, Cherel Y, Abadie J, Samuel JL, Rigaud JL, Menoret S, Anegon I, Escande D. Hum Gene Ther. 2002;13(14):1767-75.
- 6. Rescan PY, Gauvry L, Paboeuf G, Fauconneau B. Biochim Biophys Acta. 1994;1218(2):202-4.
- 7. Rescan PY, Gauvry L, Paboeuf G. FEBS Lett. 1995;362(1):89-92.

PAPEL DE LOS RECEPTORES PORCINOS DE GHRELINA Y DE SOMATOSTATINA TIPO 2 (sst2) SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

M. Molina, M. Durán-Prado, A.J. Martínez-Fuentes, F. Gracia-Navarro, J.P. Castaño, M.M. Malagón

Dpto. de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Córdoba, España.

RESUMEN. Diversos estudios han puesto de manifiesto que los receptores de los factores hipotalámicos que regulan la secreción de hormona del crecimiento (GH) por las somatotropas, los receptores de GHRH (GHRH-R), somatostatina (sst) y ghrelina/secretagogos de GH (GHS-R), pueden además mediar efectos cruciales sobre proliferación y apoptosis en éste y otros tipos celulares. No obstante, estos procesos dependen de cada (sub)tipo de receptor, del tipo de tejido y de la especie estudiada. Por todo ello, nuestro grupo ha iniciado la caracterización de los receptores porcinos GHS-R, GHRH-R y sst.

INTRODUCCIÓN

La secreción de GH por las células somatotropas de la hipófisis está regulada principalmente por dos factores hipotalámicos, el estimulador GHRH y el inhibidor somatostatina (SRIF) (1). Dichos factores también están implicados en el desarrollo y diferenciación de las somatotropas, por lo que desempeñan un importante papel en el desarrollo de respuestas patológicas como son los procesos de tumorigénesis, hipersecreción hormonal e hiperplasias (1). La acción biológica de la GHRH está mediada por su interacción con un receptor específico, GHRH-R, del cual se han identificado hasta el momento dos isoformas (2), estando presentes ambas en las somatotropas. Por su parte, hasta el momento se han identificado cinco subtipos de receptores de SRIF (sst1-sst5) (3), entre los cuales, sst1, sst2 y sst5 son los que parecen mediar los efectos de dicho péptido sobre las somatotropas (4). Recientemente se ha identificado un tercer factor, la ghrelina, que también está presente en hipotálamo e hipófisis y estimula la secreción de GH e interacciona con GHRH y SRIF en la regulación de la actividad de las somatotropas (5). La ghrelina actúa a través del receptor de secretagogos de GH (GHS-R), presente en la hipófisis (6), del que se han descrito dos isoformas, GHS-R1a y GHS-R1b (7). Actualmente se desconoce si la ghrelina, al igual que GHRH y SRIF, está implicada en la regulación de procesos de proliferación o apoptosis en las células somatotropas.

Estudios en nuestro laboratorio han permitido caracterizar la acción de GHRH, SRIF y ghrelina sobre la actividad secretora de las somatotropas porcinas. Así, hemos demostrado que tanto GHRH como ghrelina estimulan la secreción de GH (8). Sin embargo, al contrario de lo encontrado en otras especies, el SRIF a dosis altas (nM) no inhibe la secreción basal de GH y, además, a bajas dosis (pM), estimula la liberación de GH mediante una acción directa y específica sobre las somatotropas porcinas (9). Por otra parte, no se conoce el posible papel de estos factores sobre la proliferación de las somatotropas. Por ello, y con objeto de profundizar en el estudio de la acción de estos factores, nos hemos planteado caracterizar los receptores correspondientes en la especie porcina. De esta manera, hemos llevado a cabo la clonación,

transfección y caracterización funcional de las dos isoformas del receptor de ghrelina así como el análisis del efecto del receptor de SRIF sst2 sobre la proliferación celular en un sistema de expresión heterólogo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Mediante RT-PCR de ARN total de hipófisis y con el uso de cebadores especificos obtenidos a partir de las secuencias conocidas de GHSR-1a (U60178) y GHSR-1b (U60180) porcinos, se obstuvieron transcritos que fueron clonados en el plásmido pcDNA 3 y transfectados de forma estable en células CHO-K1. Para los estudios de cinética de Ca²⁺ ([Ca⁺²]_i), las células CHO-K1 transfectadas con GHSR-1a o con GHSR-1b se sembraron en cubreobjetos y se cultivaron durante 48 h, tras lo cual se les evaluó la dinámica de la [Ca⁺²]_i en respuesta a la administración de dos formas moleculares de ghrelina (n-octanoil ghrelina y desacilghrelina).

Para los estudios de proliferación celular, las células CHO-K1 transfectadas con el receptor sst2 porcino se sembraron a una densidad de 150.000 céls/pocillo en medio F12. Tras 48 h de cultivo se procedió a un lavado con 1 ml de F12 libre de suero, en el que se cultivaron durante 24 h. Los tratamientos experimentales se realizaron durante un periodo de 24 h en presencia de 0,25 μ Ci de (metil-³H) timidina, seguidos de dos lavados con NaCl 0.9%. A continuación se incubaron con ácido tricloracético (TCA) y finalmente se añadió NaOH 1N para solubilizar las células. Del homogenado resultante se usaron 400 μ l a los que se les añadió líquido de centelleo para estimar con un contador β la incorporación de timidina-³H.

RESULTADOS

La administración de ghrelina a células CHO-K1 que expresan establemente el receptor GHSR-1a provocó un aumento en la concentración intracelular de Ca²+ en aquellas células transfectadas con GHSR-1a, mientras que no se observó movilización de Ca²+ citosólico en respuesta a ghrelina tanto en células CHO-K1 sin transfectar como en aquellas células que expresaban el GHSR-1b porcino. Sin embargo, la desacilghrelina aumentó la movilización de Ca²+ citosólico en células transfectadas con el receptor GHS-R1b mientras que por el contrario, no modificó los perfiles basales de Ca²+ en las células que expresaban el receptor GHS-R 1a.

En los experimentos de incorporación de timidina-³H, los resultados mostraron que las células CHO-K1 en las que la expresión del receptor sst2 porcino es 250 veces mayor que en la hipófisis, así como en los que la expresión es tan solo 33 veces mayor, la incorporación de timidina-³H aumentó de forma significativa en respuesta a 10⁻⁷ M de SRIF y a 10⁻⁷ y 10⁻⁹ M de L-110,976 (análogo específico del sst2). Con objeto de comprobar la especificidad de la respuesta obtenida en células transfectadas con el receptor sst2 porcino (x250), evaluamos el efecto de agonistas específicos de los distintos ssts (sst1, sst2, sst3, sst4 y sst5) sobre la incorporación de timidina tritiada. Así, tan solo 10⁻⁷ M de SRIF o del agonista específico del sst2 (L-110,976) incrementaron de forma significativa la incorporación de timidina-³H.

DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos evaluado la funcionalidad de los receptores GHS-R porcinos mediante el análisis de las variaciones en la concentración de ${\rm Ca}^{2^+}$ libre citosólico en respuesta al tratamiento con ghrelina acilada, forma funcional, y desacilghrelina, aparentemente inactiva. Así, la activación del GHS-R1a desencadena un aumento de la ${\rm [Ca}^{2^+]}_i$ en respuesta a la

acilghrelina, siendo la forma desacetilada del péptido incapaz de activar de esta forma al receptor. Por el contrario, la isoforma corta del receptor, GHS-R1b, es tan solo activada por la desacil-ghrelina. Estos resultados indican que las isoformas del GHS-R muestran una afinidad selectiva por las dos formas moleculares y constituyen la primera prueba directa de la activación de GHSR-1b por una forma molecular de ghrelina, que de esta forma también podría intervenir en la regulación de la actividad de las somatotropas porcinas. Resultados preliminares indican que la ghrelina octanoilada no altera la tasa de proliferación celular en ausencia de suero, por lo que hemos procedido a analizar este proceso en condiciones de estimulación (presencia de suero o de insulina). Sorprendentemente, en el transcurso de estos estudios hemos descubierto que en células CHO que expresan de forma estable el receptor somatostatinérgico sst2, la SRIF provoca un aumento significativo de la tasa de proliferación, que puede estar relacionada con su capacidad para incrementar la [Ca2+], en dichas células. La especificidad de este efecto ha sido comprobada mediante el uso de un agonista selectivo de dicho receptor (L-779,976), que también aumenta el crecimiento de las células CHO que expresan el sst2. En suma, disponemos de un conjunto de receptores porcinos clonados que constituyen una valiosa herramienta molecular para estudiar funciones nuevas e insospechadas para estos factores reguladores de la función de las somatotropas.

Agradecimientos

Financiación: CVI-139 (JA, España), BFI 2001-2007 y BFU2004-03883 (MEC, España/FEDER).

BIBLIOGRAFÍA

- Muller EE, Locatelli V, Cocchi D. 1999. Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev* 79: 511-607.
- 2. Hassan HA 2001 Biological activities of two porcine growth hormonereleasing hormone receptor isoforms. *Arch Biochem Biophys* 387:20-26
- 3. Moller LN, Stidsen CE, Hartmann B, Holst JJ 2003 Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta* 1616:1-84
- 4. Bousquet C, Puente E, Buscail L, Vaysse N, Susini C 2001 Antiproliferative effect of somatostatin and analogs. *Chemotherapy* 47:30-39
- Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K 1999 Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature 402:656-660
- 6. Howard et al. 1996 A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 273:974-977
- 7. Petersenn S 2002 Structure and regulation of the growth hormone secretagogue receptor. *Minerva Endocrinol* 27:243-256
- 8. Luque RM, Kineman RD, Park S, Peng XD, Gracia-Navarro F, Castaño JP, Malagón MM 2004 Homologous and heterologous regulation of pituitary receptors for ghrelin and growth hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 145:3182-3189
- Ramirez JL, Castaño JP, Gracia-Navarro F 1998 Somatostatin at low doses stimulates growth hormone release from intact cultures of porcine pituitary cells. Horm Metab Res 30:175-177

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA LIPOPROTEIN LIPASA DE DORADA (Sparus aurata)

A. Saera-Vila, J.A. Calduch-Giner, J. Pérez-Sánchez

Departamento de Biología, Cultivo y Patología de Especies Marinas, Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC), Castellón, España.

RESUMEN. La LPL de dorada codifica para una proteína de 525 aa con todos los motivos estructurales de las LPLs de vertebrados superiores. La proteína madura muestra un alto grado de similitud aminoacídica (68-70%) en comparación con las LPLs de trucha arco iris y pez cebra, que disminuye hasta el 53-61% en relación con las LPLs de vertebrados superiores. Por primera vez en peces, el análisis de la expresión de la LPL en tejido adiposo, hígado y músculo esquelético muestra una clara especificidad tisular, que responde tanto a los cambios de estación como al estado nutricional de los animales en cultivo.

INTRODUCCIÓN

La lipoprotein lipasa (LPL) es un miembro de la superfamilia de las lipasas que incluye, entre otras, la lipasa hepática (HL), la lipasa endotelial (EL) y la lipasa pancreática (PL). Todos estos enzimas han evolucionado a partir de un mismo gen ancestral y desempeñan un papel clave en la absorción y metabolismo de los lípidos y lipoproteínas. La LPL cataliza la hidrólisis de los triglicéridos (TG) transportados por el torrente sanguíneo en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones. En mamíferos y aves, se ha puesto de relieve una regulación tisular específica de la LPL que tiene por objeto la captación tisular de ac. grasos para su oxidación y/o almacenamiento en forma de TG. Así pues, durante el ayuno la actividad de la LPL disminuye en el tejido adiposo, mientras que suele aumentar en corazón y músculo esquelético. En peces, la LPL sólo se ha secuenciado en unas pocas especies (trucha, pez cebra y pargo japonés), existiendo muy poca información acerca de su regulación transcripcional. Por consiguiente, el objetivo se este trabajo ha sido el clonaje y secuenciación de la LPL de dorada (Sparus aurata) para abordar, en base a la estación y fuente de proteína, su regulación transcripcional en músculo esquelético y tejidos de acúmulo graso (hígado y tejido adiposo peri-visceral).

MATERIAL Y MÉTODOS

Clonaje y secuenciación. Para amplificar el fragmento inicial de la LPL de dorada se diseñaron cebadores degenerados (CCAAYGTSATYGTGGTGGACTGGCT y CRTTKCCCASMKTGTTGCAGCGG) según las secuencias disponibles en las bases de datos. La secuencia resultante se completó mediante 3´ y 5´ RACE, con cebadores específicos.

Expresión de LPL. La expresión de la LPL se analizó mediante PCR en tiempo real (SYBR Green I), usando la β-actina como gen constitutivo. La especificidad del producto amplificado se comprobó mediante secuenciación y análisis de las curvas de fusión.

Condiciones experimentales. Juveniles de dorada se cultivaron en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura en las instalaciones del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS-CSIC, Castellón).

En el estudio de la regulación estacional, juveniles de dorada alimentados con una dieta comercial basada en harina de pescado (Proaqua) fueron muestreados regularmente a lo largo de todo un ciclo de cultivo. Para determinar el efecto de la fuente de proteína sobre la expresión de LPL, juveniles de dorada fueron alimentados durante el periodo estival con una dieta basada en harinas de pescado (FM) o en proteínas de origen vegetal (PP100) (1).

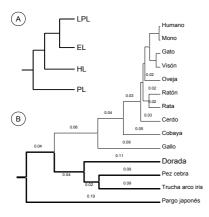


Figura 1. Esquema del árbol filogenético de la superfamilia de las lipasas (A). Detalle del grupo de la LPL (B), la línea gruesa indica las secuencias de peces.

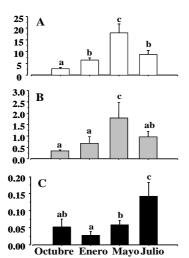


Figura 2. Expresión relativa de LPL en tejido adiposo (A), hígado (B) y músculo (C). Las letras indican diferencias significativas entre grupos

RESULTADOS

secuencia obtenida de LPL (AY495672) consta de 1669 pares de bases (bp), en la que se incluyen 83 bp de región no traducida en 3' (3'UTR), 11 bp de 5'UTR y una pauta abierta de lectura de 525 aminoácidos (aa) con un péptido señal de 23 aa, la triada catalítica, el polipéptido "lid" (implicado en la especificidad de sustrato) y cuatro sitios de N-glicosilación. La proteína madura presenta una notable similitud (68-70%) con la LPL de pez cebra y trucha arco iris, que se mantiene en un 53-61% al comparar la LPL de dorada con la LPL de vertebrados superiores, pero que disminuye hasta 47.8% al analizar la LPL de pargo japonés (Fig. 1).

Con independencia de la situación experimental, los resultados obtenidos muestran una clara regulación a nivel tisular en la expresión de LPL: tejido adiposo > hígado > músculo.

Es más, la regulación de la LPL a nivel hepático y de tejido adiposo mostró un patrón similar con un máximo en primavera. Por el contrario, el pico de expresión a nivel muscular se alcanzó durante la fase estival (Fig. 2).

La fuente de proteína no afectó significativamente a la expresión de LPL a nivel de tejido muscular. No obstante, la sustitución de las harinas de pescado por harinas vegetales aumentó la expresión hepática de LPL, mientras que la disminuyó en el tejido adiposo peri-visceral (Fig. 3).

DISCUSIÓN

La LPL de dorada está altamente relacionada con la de trucha y pez cebra, lo que pone de relieve un alto grado de conservación de este enzima a lo largo de la evolución de los peces, aunque la LPL de pargo japonés muestra una clara evolución divergente. En cualquier caso, todas las LPLs descritas por el momento muestran una notable conservación de todos los motivos estructurales. El patrón de cisteínas está también conservado, aunque el último par de cisteínas no está presente en pez cebra, trucha y dorada.

Las variaciones estacionales en la expresión de LPL, explican al menos en parte los cambios acontecidos en la deposición y utilización de los lípidos como fuente de energía. Así pues, el aumento de la expresión de LPL a nivel hepático y de de tejido adiposo estaría en consonancia con la reposición de las reservas grasas después del periodo invernal. Por el contrario, el incremento estival de la LPL a nivel de músculo esquelético favorecería la captación y oxidación de ac. grasos por el tejido muscular durante el periodo

de máximo crecimiento, acompañado de un incremento en la actividad del eje somatotrópico (2, 3).

Los cambios observados en la expresión de LPL a nivel hepático y de tejido adiposo en función de la fuente de proteína también muestran un claro sentido fisiológico. De hecho, animales alimentados con proteínas enteramente de origen vegetal presentan un alto acúmulo graso en el hígado (1), lo que va acompañado de un incremento de la expresión de

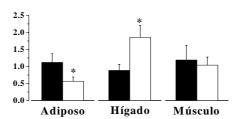


Figura 3. Expresión relativa de LPL en peces alimentados con la dieta FM (Negro) o PP100 (blanco). Los asteriscos indican diferencias significativas entre grupos.

LPL hepática. Por el contrario, estos animales muestran una menor deposición grasa en el tejido adiposo peri-visceral, lo que va ligado en este estudio a la disminución de la expresión de LPL. De acuerdo con ello, experiencias previas de cultivo *in vitro* de adipocitos han puesto de manifiesto un incremento de la actividad lipolítica en células aisladas a partir de animales alimentados con la dieta PP100 (4).

En resumen, el estudio de la expresión de la LPL se muestra como una herramienta de notable utilidad para entender la regulación del metabolismo lipídico bajo diferentes condiciones fisiológicas y de cultivo.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por proyectos de la U.E. (Q5RS-2000-30068; "Perspectives of Plant Protein Usage in Aquaculture", PEPPA) y el Ministerio Español de Educación y Ciencia (AGL2004-06319-C02-01). Estos resultados forman parte de un trabajo recientemente publicado (5).

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Gómez-Requeni P, Mingarro M et al. 2004 Aquaculture 232:493-510.
- 2. Pérez-Sánchez J, Calduch-Giner JA et al. 2002 Fish Physiol Biochem 27:243-258.
- 3. Calduch-Giner JA, Mingarro M et al. 2003 Comp Biochem Physiol 136B:1–13.
- 4. Albalat A, Gómez-Requeni P et al. 2005 Am J Physiol 289:R259-R265.
- Saera-Vila A, Calduch-Giner JA et al. 2005 Comp Biochem Physiol 142B: 224-232

BRAIN GLYCOGENOLYSIS IS INDUCED BY SEROTONIN IN THE RAINBOW TROUT (Oncorhynchus mykiss)

J.J. Perez, M Mancebo, R.I. Caamaño, L. Rodríguez, M. Aldegunde

Laboratorio de Fisiología Animal (Instituto de Acuicultura) Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela. España.

ABSTRACT. The goal of the present study was to determine if serotonin (5-HT) can modulate brain energy expenditure. The levels of brain and liver glycogen as well as plasma glucose were determined 60 min after icv injection of 1 μ l/fish of saline (controls) or containing 5 doses of 5-HT (0.512, 1.28, 3.2, 8, 20 μ g/ μ l) (dose-response experiments) or at 4 different times (20, 60, 120, 180 min) after the administration of a single dose (1.28 μ g/ μ l) of 5-HT (time-response experiments). 5-HT central administration had no effect neither plasma glucose nor hepatic glycogen levels in any of the experimental conditions. On the contrary, 5HT icv administration induced a significant decrease in brain glycogen levels, time and dose dependant. In summary, our results show for the first time in fish, that central 5-HT can be a regulatory neurotransmitter of brain energy expenditure activating local glycogenolysis.

INTRODUCTION

The accepted role of brain glycogen in vertebrates, the largest energy reserve available in the central nervous system (CNS), is that it is utilized when glucose falls. However, how glycogen turnover occurs and how glycogen levels are coordinated with synaptic activity still remain to be elucidated (5). Neurotransmitters are molecules that regulate energy metabolism in the CNS It's well stablished in mammals that central and peripheric serotonin (5-HT) plays a key role in regulating plasma glucose levels. The 5-HT induced-hyperglucemy is related to the release of catecholamines from the adrenal gland. In fish, there is some evidence about catecholamine release regulation by 5-HT, however, the possible function of central and/or peripheric 5-HT on glucose homeosthasis is still unknown.

The aim of this work was to study the effect of 5-HT central administration (intracerebroventricular) on: plasma glucose, liver glycogen and brain glycogen levels.

MATERIAL AND METHODS

Experimental procedure: Rainbow trouts (50-70 g), Oncorhynchus mykiss, were food deprived 24 h before experiments. Fish were anesthetized with MS222 (50 mg/L MS-222 buffered to pH 7.4 with sodium bicarbonate) before intracerebroventricular (icv) injection with saline (0,6% ClNa) or 5-HT and before obtaining samples. Icv administration was based on stereotaxic atlas of Billard and Peter's method (1) with some modifications. Blood was collected from the caudal peduncle and centrifuged for plasma separation and aliquots were stored at -80°C. Liver and brain were removed for glycogen determination.

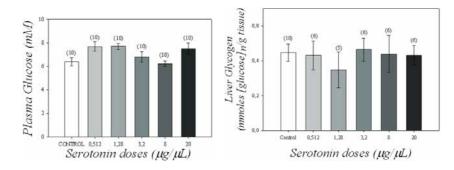
Plasma glucose was determined using the method of the glucose-oxidase-peroxidase a (commercial kit Spinreact, Spain).

Liver and brain glycogen concentration was determined according to the method described by Keppler and Decker (2) modified for Figueroa et al. (3).

Statistics: Data are expressed as mean \pm S.E.M. The significance of differences between means was evaluated using T-test or One-Way ANOVA followed by Student-Newman Keuls multiple range test.

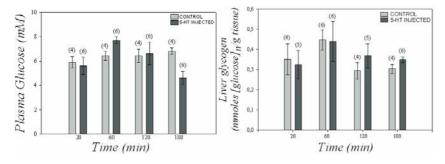
RESULTS

Figures 1 and 2 show the changes in plasma glucose and liver glycogen levels after the icv administration of different 5-HT doses (0.512, 1.28, 3.2, 8, 20 $\mu g/\mu l$):



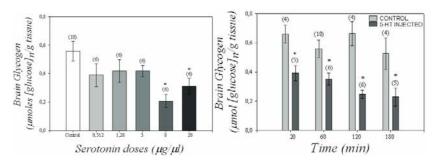
Figures 1 and 2. Changes in plasma glucose and liver glycogen levels.

Figures 3 and 4 show the changes in plasma glucose and liver glycogen levels measured after the icv administration of a 5-HT dose (1.28 μ g/ μ l) at different times (20, 60, 120, 180 min):



Figures 3 and 4. Changes in plasma glucose and liver glycogen levels.

Changes in brain glycogen levels after the icv administration of different 5-HT doses (0.512, 1.28, 3.2, 8, 20 μ g/ μ l) (Figure 5) and in brain glycogen levels (Fig. 6) after the icv administration of a 5-HT dose (1.28 μ g/ μ l) at different times (20, 60, 120, 180 min):



Figures 5 and 6. Changes in brain glycogen levels. (*<0,05)

DISCUSSION

The results suggest that in trout 5-HT could be a potential regulatory neurotransmitter of brain energy expenditure activating local glycogenolysis and this neurotransmitter does not seem to act on the sympathetic nervous system (SNS) which, as it occurs in mammals, produces an hyperglucemic effect as a consequence of the regulation of catecholamines release from interrenal tissue. This fact agrees with results observed previously in the rainbow trout (4), in which the cerebral hypoglycemia induced for 2-deoxy-d-glucose was unable to active SNS, in contrary to that observed in mammals in similar experimental conditions.

Acknowledgments

This study was supported by Xunta de Galicia research Grant (PGIDIT03PXIB20001PR) to M. Aldegunde.

REFERENCES

- Billard R, Peter RE 1982 A stereotaxic atlas and technique for nuclei of the diencephalon of rainbow trout (Salmo gairdneri). Reprod Nutr Develop 22(1A):1-25.
- Keppler D, Decker K. 1974 Glycogen: Determination with amyloglucosidase. In Methods of Enzymatic Analysis pp. 1127-1131. Bergmeyer HU (ed). Academic Press, New York.
- 3. Figueroa RI, Rodriguez-Sobaris R, Aldegunde M, Soengas JL 2000 Effects of food deprivation on 24h-changes in brain and liver carbohydrate and ketone body metabolism of rainbow trout. J Fish Biol 57:631-646.
- Soengas JL, Aldegunde M 2004 Brain glucose and insulin: effects on food intake and brain biogenic amines of rainbow trout. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol 190:641-9.
- 5. Soengas JL, Aldegunde M 2002 Energy metabolism of fish brain Comp Biocem. Physiol B 131:271-296.

EFECTOS DIRECTOS DE KISS-1 SOBRE LAS SOMATOTROPAS Y LAS GONADOTROPAS HIPOFISARIAS

E. Gutiérrez-Pascual, A.J. Martínez-Fuentes, F. Rodríguez-Pacheco, M. Durán-Prado, M. Tena-Sempere, M.M. Malagón, J.P. Castaño

Dpto. de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Córdoba, España.

RESUMEN. El péptido KiSS-1 (kisspeptina-54 o metastina) y su receptor GPR54 juegan un importante papel en el control neuroendocrino del eje reproductor, estimulando la secreción de gonadotropinas (LH y FSH), mediante una acción sobre la secreción de GnRH por el hipotálamo. Aunque la hipófisis expresa niveles elevados de GPR54, la acción directa de KiSS-1 sobre las células hipofisarias no es bien conocida. Para esclarecer este asunto, evaluamos la dinámica de calcio libre citosólico ([Ca²⁺]_i) en células individuales en cultivo en respuesta a KiSS-10 e inmunoidentificamos los tipos celulares que respondieron. Además, para determinar el posible efecto directo de KiSS-10 sobre la secreción hormonal, realizamos tratamientos con distintas dosis de KiSS-10 sobre cultivos de células adenohipofisarias de rata y evaluamos la secreción de LH por RIA. Los resultados demuestran que KiSS-10 actúa de forma directa sobre las células adenohipofisarias de rata, elevando la [Ca²⁺]. En concreto, KiSS-10 actúa, además de sobre las gonadotropas, sobre las somatotropas, induciendo aumentos significativos de la [Ca²⁺]_i. Los datos obtenidos mediante RIA indican que KiSS-10 estimula la secreción de LH tanto en hembras como en machos prepúberes. En conjunto, nuestros resultados indican que la acción directa de KiSS sobre la hipófisis podría contribuir a la potente estimulación de la liberación de LH inducida por este péptido in vivo. Además, nuestros datos demuestran, por primera vez, que KiSS-10 también estimula de forma directa otro tipo celular, las somatotropas.

INTRODUCCIÓN

KiSS-1 (kisspeptina-54 o metastina) es un péptido de 54 aminoácidos codificado por el gen KiSS-1, que se caracterizó originalmente por su capacidad para inhibir metástasis tumoral mediante su unión al receptor acoplado a proteínas G, GPR54 (1). Sin embargo, en estudios posteriores se observó que la mutación del gen GPR54 provocaba hipogonadismo hipogonadotrópico e infertilidad en humano y ratón, lo que desveló un papel clave del tándem KiSS-1/GPR54 en el control neuroendocrino del eje reproductor (2). Así, estudios recientes demuestran que la administración de KiSS-1 in vivo induce un notable aumento de la secreción de gonadotropinas (hormonas luteinizante, LH, y foliculoestimulante, FSH), provocado por la acción estimuladora de KiSS sobre la secreción de GnRH por el hipotálamo, donde se localizan receptores GPR54 (2). Curiosamente, pese a que la hipófisis también posee una elevada expresión de GPR54, aún no se conocen los efectos directos que causa KiSS-1 sobre las gonadotropas u otros tipos celulares hipofisarios. Por todo ello, decidimos realizar un análisis de la acción directa de KiSS-1 sobre las células hipofisarias de rata mediante una doble estrategia metodológica. Por una parte, evaluamos la dinámica de calcio libre citosólico ([Ca²⁺]_i) en células individuales en cultivo en respuesta al tratamiento con KiSS-10 (10⁻⁶M), un decapéptido que contiene la región bioactiva de KiSS-1, y a continuación realizamos una identificación inmunocitoquímica de las células utilizando anticuerpos contra diversas hormonas hipofisarias, especialmente LH y hormona del crecimiento (GH), al objeto de determinar los tipos celulares hormonales que responden a KiSS-10. Por otra, para conocer su posible efecto directo sobre la secreción hormonal, realizamos tratamientos con distintas dosis y tiempos de incubación de KiSS-10 sobre cultivos de células hipofisarias de rata y evaluamos la secreción de LH por RIA.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó sobre ratas hembra (25-30 días) y macho (42 días), prepúberes, cumpliéndose todas las normas legales vigentes y las directrices del Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de luz y temperatura, y se alimentaron ad libitum. Se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se extrajeron las hipófisis y se transfirieron a medio estéril (MEM, pH 7,4, 4°C) suplementado con seroalbúmina bovina (BSA) y antibiótico-antimicótico. Las glándulas se dispersaron enzimática y mecánicamente siguiendo un protocolo descrito previamente (3). Para los experimentos de secreción, las células dispersas se sembraron en placas de 24 pocillos, a una densidad de 300.000 cél/pocillo/ml DMEM (suplementado con 1% antibiótico-antimicótico, 10% suero fetal bovino, FBS y 1% gentamicina) y se mantuvieron en cultivo durante 3 días a 37°C, 5% CO2. El día del experimento, el medio con suero se reemplazó por MEM sin FBS durante 2-4 h y, a continuación, las células se trataron durante 30 min ó 4 h con las correspondientes sustancias a las concentraciones indicadas. Finalizado el tratamiento, el medio se recogió y se centrifugó (6000 x g, 5 min) y el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta la medida de hormona por RIA. Para las medidas de [Ca²⁺]_i, las células se sembraron en cubres reticulados de 25 mm a una densidad de 50.000 cél/placa, en 2 ml de DMEM. Para los ensayos de microfluorimetria, las células se incubaron 30 min a 37°C con 2,5 μM de sonda Fura-2 AM en DMEM sin rojo fenol con NaHCO₃ y HEPES (pH 7.4), se lavaron 15 min con el mismo medio DMEM sin Fura-2 y se evaluaron mediante un microscopio Nikon conectado a una cámara digital Hamamatsu. Las células se expusieron alternativamente a longitudes de onda de 340 y 380 nm y la intensidad de la luz emitida a 505 nm se midió cada 5 s. Los cambios en la [Ca²⁺]i se registran en forma de ratios (F340/380) usando el programa MetaFluor (Imaging Corporation, West Chester, PA). Tras las medidas de [Ca²⁺]_i las células se identificaron mediante inmunofluorescencia (3).

RESULTADOS

Los ensayos de Ca²⁺ demostraron que, en efecto, el KiSS-10 (10⁻⁶ M) actúa de forma directa sobre las células adenohipofisarias de ratas macho prepúberes. En concreto, la inmunocitoquímica post-facto demostró que este péptido actúa fundamentalmente sobre dos tipos celulares, las gonadotropas (LH), un 9,5 % de las cuales respondieron a KiSS-10, y las somatotropas (GH), que respondieron en mayor proporción (16,5%). KiSS-10 indujo aumentos similares y significativos de la [Ca²⁺]_i en ambos tipos celulares: un 60% sobre el basal en gonadotropas y un 62,8% en somatotropas GH. Asimismo, en ambos casos, las cinéticas de aumento de la [Ca²⁺]_i en respuesta a KiSS-10 presentaron dos tipos de perfiles: pico y plateau.

Para conocer el efecto directo de KiSS-10 sobre la secreción de LH, tratamos cultivos de células hipofisarias con diferentes concentraciones de KiSS-10

solo y combinado con GnRH. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con KiSS-10 (10⁻¹⁰ M - 10⁻⁶ M; 30 min) estimula la secreción de LH tanto en hembras como en machos de forma moderada pero significativa, siendo la dosis 10⁻⁸ M la más efectiva. Además, los tratamientos combinados con KiSS 10⁻⁸ M y GnRH 10⁻⁸ M (30 min ó 4 h; ratas macho) indicaron que KiSS-10 no potencia significativamente la acción estimuladora del GnRH.

DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra por vez primera que el péptido KiSS-10 actúa de forma directa sobre las células hipofisarias de rata, concretamente sobre las gonadotropas y las somatotropas, induciendo sobre ellas un aumento de la [Ca²+]i y estimulando la secreción hormonal. Estos datos sugieren que la expresión de GPR54 en hipófisis puede tener un significado funcional, previamente desconocido, ya que el KiSS-1 es capaz de estimular la secreción de LH en células hipofisarias de ratas prepúberes tanto de hembra como de macho, y de una forma rápida (30 min) y sostenida (4 h). Por todo ello, y aún cuando las acciones centrales (hipotalámicas) que ejerce KiSS sobre el eje gonadotrópico muestran una magnitud claramente superior a las observadas sobre la hipófisis (2), parece razonable sugerir que, de acuerdo con nuestros resultados, la acción directa de este péptido sobre la hipófisis puede contribuir a su potente efecto *in vivo* sobre la liberación de LH. Más aún, nuestros hallazgos indican además, por primera vez, que KiSS-10 también estimula de forma directa otro tipo celular, las somatotropas.

Agradecimientos

Financiación: CVI-139-Junta de Andalucía; BFI 2001-2007, BFU2004-03883-MEC; PI042082-Instituto de Salud Carlos III-MSC.

BIBLIOGRAFÍA

- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor 2001 Nature 411:613-617
- 2. Tena-Sempere M 2005 Hypothalamic KiSS-1: the missing link in gonadotropin feedback control? *Endocrinology* 146:3683-3685
- 3. Malagón MM, Luque RM, Ruiz-Guerrero E, Rodriguez-Pacheco F, Garcia-Navarro S, Casanueva FF, Gracia-Navarro F, Castaño JP 2003 Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. *Endocrinology* 144:5372-5380.

EFECTOS DE INSULINA E IGF-I SOBRE LA EXPRESIÓN DE GH Y DE LOS RECEPTORES DE GHRH (GHRH-R) Y GRELINA (GHS-R), EN CÉLULAS HIPOFISARIAS DE RATÓN Y PAPIÓN (Papio anubis) EN CULTIVO

R.M. Luque^{1,2}, M.D. Gahete^{1,2}, M.M. Malagón¹, J.P. Castaño¹, R.D. Kineman²

¹Dpto. de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Córdoba, España. ²Dpt. of Medicine, University of Illinois at Chicago, Jesse Brown VA Medical Center, Chicago, Illinois, USA.

RESUMEN. Desde hace más de dos décadas, se sabe que la insulina ejerce una acción directa sobre las células somatotropas, inhibiendo la síntesis de hormona del crecimiento (GH), y que el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) es un mediador esencial de las funciones de la GH y una molécula clave en su regulación negativa. El objetivo de este estudio fue analizar mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real los posibles efectos diferenciales de insulina e IGF-I sobre diversos componentes del eje fisiológico de la GH en dos especies distintas, ratón y papión. Los resultados obtenidos indican que las somatotropas poseen receptores funcionales tanto para insulina como para IGF-I y que ambas hormonas regulan directa o indirectamente varios componentes de dicho eje, incluidos los receptores estimuladores e inhibidores de la función somatotropa. Sin embargo, los mecanismos que activan estas dos hormonas para ejercer sus efectos no son idénticos en las dos especies estudiadas.

INTRODUCCIÓN

Los individuos obesos suelen presentar dos características fisiológicas muy destacadas. Por un lado, una disminución de los niveles de GH circulante y una respuesta reducida a los secretagogos de GH (GHRH y ghrelina), que pueden recuperarse tras una pérdida de peso. La segunda característica es la resistencia a insulina, que les provoca un incremento compensatorio en los niveles circulantes de dicha hormona. Por otra parte, se sabe que la administración de insulina actúa directamente sobre la hipófisis suprimiendo la síntesis de GH (1), por lo que la hiperinsulinemia podría contribuir a la supresión de GH asociada a la obesidad a través de una inhibición directa de las somatotropas. En el presente estudio, aplicamos una RT-PCR cuantitativa a tiempo real para investigar si la insulina afecta también a otros aspectos de la función somatotropa, abordando tres objetivos concretos:

- 1.- Examinar el efecto directo de la insulina sobre los niveles de ARNm de los receptores de GHRH (GHRH-R), ghrelina (GHS-R) y somatostatina tipo 2 (sst2), en cultivos primarios de células hipofisarias de ratón.
- 2.- Comparar los efectos de la insulina y el IGF-I, un componente crucial en la regulación por feedback negativo de la GH a nivel hipofisario. Además insulina e IGF-I, a altas concentraciones, pueden unirse y activar el receptor del otro.
- 3.- Determinar si los efectos directos de la insulina y el IGF-I sobre la función somatotropa son dependientes de la especie, mediante la comparación de la respuesta de cultivos primarios de células hipofisarias de ratón y papión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo las cuantificaciones, se extrajo el ARN total de tejidos completos o cultivos celulares primarios de hipófisis de ratón (machos,

C57Bl/6J) y de papión (hembras, *Papio anubis*) tratados con insulina o IGF-I (0,5-50 nM), durante 4 ó 24 h y en ausencia de suero. A continuación, el ARN total fue retrotranscrito (RT) y procesado por PCR cuantitativa en tiempo real para evaluar los niveles de ARNm de GH, y de los receptores de insulina (INS-R), IGF-I (IGFI-R), GHRH (GHRH-R), ghrelina/secretagogos de GH (GHS-R) y el de somatostatina de tipo 2 (sst2), tal como se ha descrito previamente (2 y 3).

Para la evaluación de la expresión del INS-R y el IGF-IR en los distintos tejidos, los valores se calcularon como número de copias por 0,05 µg de RNA total, ya que encontramos que los niveles de varios genes de expresión constitutiva (ciclofilina, GAPDH o HPRT) variaban entre los distintos tipos de tejidos. Para la evaluación del efecto del tratamiento insulina/IGF-I sobre los niveles de ARNm de GH, GHRH-R, GHS-R y sst2 en cultivos hipofisarios primarios, los valores se calcularon como número de copias de ARNm con respecto al número de copias de ARNm del ciclofilina, ya que éstos no se alteran en los tratamientos *in vitro*. Los resultados se obtuvieron a partir de 3-4 experimentos *in vitro* (cada uno con grupos de 3-4 pocillos/tratamiento) realizados con preparaciones separadas de cultivos celulares de hipófisis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con la importante función de la insulina y su receptor INS-R en la regulación directa de la actividad hipofisaria, los resultados obtenidos mediante RT-PCR cuantitativa del ARNm del INS-R revela que sus niveles de expresión en la hipófisis tanto en ratón como en papión son comparables o incluso superiores a los observados en tejidos considerados clásicamente como dianas de la insulina (tejido adiposo, muscular y hepático). Además, el estudio del número de copias de ARNm del IGF-IR en varios tejidos de ratón y papión demuestra que la hipófisis expresa los mayores niveles de IGF-IR en comparación con los otros tejidos estudiados. Así, pese a ser el hígado la principal fuente de IGF-I circulante, los niveles hepáticos de ARNm de IGF-IR son extremadamente bajos en ambas especies, tal como se ha descrito previamente (4).

Tanto la insulina como el IGF-I redujeron los niveles de ARNm de GH en cultivos celulares primarios de hipófisis de ratón y papión, de forma dosis-dependiente. Asimismo, los dos péptidos disminuyeron los niveles de ARNm de GHRH-R y GHS-R en cultivos de ratón y de papión. En cambio, la insulina y el IGF-I aumentaron la expresión del receptor inhibidor de la secreción de GH, el sst2, en cultivos celulares primarios de hipófisis de ratón, estando aún en estudio su efecto sobre el sst2 en células de papión.

En ratón, el efecto inhibidor de insulina e IGF-I sobre los niveles de ARNm de GH y GHRH-R solo se observó tras 24 h, pero no fue aparente a las 4h de tratamiento. Por el contrario, ambos péptidos disminuyeron los niveles de ARNm de GHS-R y aumentaron los de sst2 a las 4h de forma comparable a lo observado tras 24h de incubación. Esta respuesta tardía de GH y GHRH-R puede deberse a una mayor estabilidad de sus ARNm y/o a que las acciones de insulina e IGF-I sobre la expresión de estos genes sean indirectas.

El hecho de que, en el caso del ratón, los efectos de insulina e IGF-I sobre los niveles de ARNm en la hipófisis sean comparables sugeriría que estos péptidos pueden mediar sus efectos a través de los mismos receptores y/o rutas de señalización. Sin embargo, los efectos a corto plazo (4h) de insulina e IGF-I sobre cultivos hipofisarios de papión son claramente divergentes. La insulina inhibe significativamente los niveles de ARNm de GHRH-R y GHS-R tras 4h de incubación, mientras que IGF-I aumenta su expresión. Estos datos

apoyan la hipótesis de que la insulina puede actuar sobre la hipófisis mediante receptores y/o mecanismos distintos al del IGF-I.Se sabe que la insulina y el IGF-I pueden inhibir la transcripción a través de la ruta de transducción de señales de la fosfatidil inositol-3-quinasa (PI3K) en algunos tejidos como hígado, tejido adiposo o músculo (5). Para determinar si dicha ruta media la reducción de los niveles de ARNm de GH inducida por insulina e IGF-I en hipófisis, tratamos cultivos celulares primarios de hipófisis de papión con insulina o IGF-I en presencia de un inhibidor de PI3K (LY294002), y observamos que este compuesto bloqueó la acción inhibidora de la insulina sobre los niveles de ARNm de GH, mientras que no alteró el efecto del IGF-I. Estos resultados, junto con los anteriores, apoyan la hipótesis de que, al menos en el papión, la insulina regula la función de la somatotropa mediante la unión a sus propios receptores y la subsiguiente activación de rutas de señalización intracelular distintas a las activadas por IGF-I.

En resumen, nuestros resultados demuestran que la hipófisis de ratón y papión expresan INS-R a niveles comparables, si no mayores, a los de tejidos considerados típicamente sensibles a insulina, lo que apoya la importancia de las acciones directas de la insulina sobre esta glándula y que estas sean distintas a las del IGF-I y mediadas a través de distintos receptores. Más aun, nuestros hallazgos apoyan la hipótesis de que unos niveles elevados de insulina, como los que se observan en la obesidad (6), pueden tener un efecto rápido y directo, a través de un receptor-señalizador específico, sobre la función de la somatotropa, lo que incluye cambios tanto en la síntesis de GH como en la sensibilidad a secretagogos de GH hipotalámicos y sistémicos.

Agradecimientos

Consejería Educación, Junta de Andalucía (RML); NIH NIDDK 30677 (RDK); Endocrine Society Fellowship Award (MDG); CVI-139, Junta de Andalucía; BFI 2001-2007 y BFU2004-03883, Ministerio de Educación y Ciencia (JPC, MMP).

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Melmed et al. 1985 Insulin suppresses rat growth hormone messenger ribonucleic acid levels in rat pituitary tumor cells. *Diabetes* 34:409-412.
- 2. Yamashita, Melmed et al. 1986 Insulin regulation of rat growth hormone gene transcription *J Clin Invest* 78:1008-1014.
- 3. Morita et al. 1987 Insulin-like growth factor I action on rat anterior pituitary cells: effects of intracellular messengers on growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 121:2000-2006.
- 4. Werner et al., 1989 Developmental regulation of the rat insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:7451-7456
- Voss et al. 2000 Insulin-like growth factor-1 causes a switch-like reduction of endogenous growth hormone mRNA in rat MtT/S somatotroph cells Endocrine 13:71-79
- Scacchi et al. 1999 Growth hormone in obesity Int J Obes Relat Metab Disord 23:260-271.

PUTATIVE GLUC/GIP RECEPTOR GENES IN VERTEBRATES

V. Pinto, J. Cardoso and D.M. Power

Centre of Marine Sciences, Universidade do Algarve, 8005-139 Faro, Portugal.

ABSTRACT. The glucagon (Gluc) and glucose insulinotrophic peptide (GIP) are important brain-gut peptides and their role in glucose metabolism and insulin regulation in mammals is well described. Although the Gluc receptor (GlucR) has been isolated and widely studied in a variety of vertebrates GIPR has only been identified in mammals and nothing is known about their existence and function in other vertebrates such as teleost fish. The main objective of the present study was to isolate putative fish Gluc/GIP receptor genes in silico using genomic and EST database searches and clone the cDNA from sea bream. Duplicate receptors for Gluc/GIP receptors were identified in Takifugu and Tetraodon genomes and a single cDNA for a putative GIP receptor gene was isolated from a sea bream ovary cDNA library. The putative sea bream Gluc/GIP receptor clone isolated encodes a protein of 408 aa which shares 85% amino acid sequence similarity with the mammalian GIPR genes. Interestingly, the tissue distribution of sea bream putative GIPR revealed that it is coincident with the goldfish GlucR gene and is expressed in the liver, gonads and gills.

INTRODUCTION

The Gluc/GIP receptors have been identified in several vertebrate species and based upon sequence conservation have been grouped within the family 2 GPCRs with the GLP1 and 2 receptors. In common with other family 2 receptor members the Gluc/GIPR genes encode a large N-terminal hydrophilic extracellular domain characterised by the presence of six conserved cystein amino acid residues important for interacting with the ligands. Seven hydrophobic transmembrane domains anchor the receptor in the cell membrane and a C-terminal intracellular domain interacts with G-proteins and mediates the cell response. The GlucR gene has been identified and its function characterised in several vertebrate species and only a single receptor gene has been isolated from a teleost fish (1). In vertebrates, GlucR seems to have an important physiological role in gluconeogenesis and glycogenolysis in the liver. In contrast, the GIPR gene has only been isolated from mammals and seems to be associated with insulin regulation in the intestine (2)

The few studies that exist in teleosts show that GlucR share similar functions with mammalian receptors however nothing is known about the existence or function of GIPR genes in non-mammalian species. In order to better understand the role of the GlucR and GIPR genes in a non-mammalian species, we have used teleost fish as model species in which to investigate the function and evolution of this family of receptor genes using a sequence comparative approaches and cDNA library screening.

MATERIAL AND METHODS

Isolation of the sbGluc/GIP receptor gene and tissue distribution

A sea bream ovary cDNA library was screened using a partial cDNA fragment of a putative sea bream Gluc/GIP receptor gene (Cardoso et al., unpublished). A probe of 1300bp, comprising the full receptor gene sequence but lacking the C-terminal region was used for screening. RT-PCR combined with Southern

blot analysis was carried out in order to examine the tissue expression of the putative sea bream Gluc/GIP receptor. The PCR products obtained were detected by Southern blot using a specific probe.

Teleost database searches and sequence comparative analysis

The sea bream Gluc/GIP receptor gene sequence was used to search Tetraodon (http://www.genoscope.cns), Atlantic salmon (www.salmongenome.no/), Medaka (http://mbase.bioweb.ne.jp/), zebrafish (http://www.sanger.ac.uk) and Takifugu (http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk) databases using the BLAST algorithm sequence comparisons were carried out by multiple sequence alignments using the ClustalX programme and the phylogenetic tree was constructed using receptor TM domains 2, 4, 5 and 6 with the neighbour joining method and displayed with Treeview. Receptor transmembrane domain regions were identified using the TM prediction programme TMHMM 2.0 (http://www.cbs.dtu.dk/) and the signal peptide with SignalP 3.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/).

RESULTS

A sea bream putative Gluc/GIP receptor clone of 1521bp was obtained and DNA sequence analysis revealed a single open reading frame that encodes a protein of 408 amino acids (aa). The sea bream receptor gene shares high aa sequence similarity with the teleost GlucR genes from goldfish and zebrafish (82%, and 76%, respectively) and the human GIPR (85%) gene. Sequence comparison of the predicted protein product together with *in silico* analysis identified the presence in the sbGluc/GIP clone of seven transmembrane domains characteristic of G protein-coupled receptor genes. The N-terminal region only contained four conserved cystein residues, as opposed to six cysteins common in all vertebrate homologue receptor genes and no putative signal peptide sequence is predicted. No N-glycosylation site (NRT motif) characteristic of all members of this family is present. Tissue expression analysis of the putative sea bream Gluc/GIP receptor gene revealed it is present in the liver, gonads and gills.

Sequence similarity database searches carried out with teleost fish databases have found duplicated members of this family in the *Tetraodon* and *Takifugu* genomes and a single member in the zebrafish. No putative receptor genes were identified in any of the EST databases. Phylogenetic analysis carried out with all vertebrates Gluc/GLP and GIP receptor genes in public databases and identified in the present study revealed that all gene family members seem to have evolved from a common ancestral gene prior to the emergence of teleost fish (Fig 1). The putative sea bream Gluc/GIP receptor is more closely related to the zebrafish predicted GlucR gene which according to the tree shares the same ancestor as the mammalian GIPRs.

DISCUSSION

Glucagon and GIP receptor genes have been identified and characterised in teleost fish *in silico* and by cDNA library screening. Duplicate Gluc/GIP receptor genes have been identified for the first time in *Takifugu* and *Tetraodon* genomes. Two putative GIP receptor genes have been isolated in zebrafish and in sea bream which share high sequence similarity with the mammalian GIP receptor genes. Tissue distribution of the putative sea bream GIP receptor gene revealed that it has a similar tissue distribution to the vertebrate Glucagon receptors and is expressed in the liver where it appears to play a role in glucose metabolism.

It remains to be established if the sea bream putative GIPR is functional and its role *in vivo*. It will be important to isolate sea bream GlucR in order to establish if its function and tissue distribution are similar to GIPR.

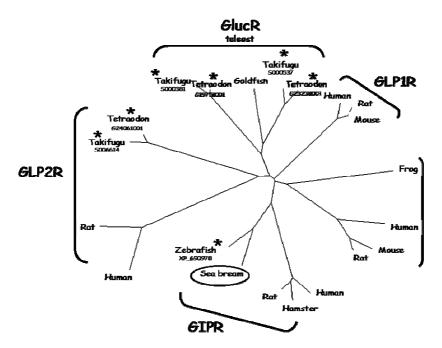


Figure 1. Phylogenetic tree using the Neighbour Joining method of the vertebrate receptor genes for GlucR, GLPRs and GIPR. The putative teleost GLUC/GIP receptor genes identified *in silico* are annotated with a star (*). The sea bream receptor gene is circled.

Acknowledgments

This work was financed by a CCMAR pluriannual fellowship. João Cardoso is in receipt a Fundação para a Ciência e Tecnologia fellowship (POCTI/SFRH/BDP/14449/03).

REFERENCES

- Chow B, Moon T, Hoo R, Yeung C, Muller M, Christos P, Mojsov S, 2004 Identification and Characterization of a Glucagon Receptor from the Goldfish Carassius auratus: Implications for the Evolution of the Ligand Specificity of Glucagon Receptors in Vertebrates, Endocrinology 145: 3273-3288
- Hansotia T, Drucker D, 2005 GIP and GLP-1 as incretin hormones: lessons from single and double incretin receptor knockout mice; Reg Pept 128: 125-134

EL NUEVO ANÁLOGO SINTÉTICO SOM230 OFRECE NUEVAS PRUEBAS SOBRE EL EFECTO DUAL DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA LIBERACIÓN DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO

A.J. Martínez-Fuentes¹, R.M. Luque¹, H.A. Schmid², M.M. Malagón¹, J.P. Castaño¹

¹Dpt. de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Univ. de Córdoba, España. ²Novartis Institutes for Biomedical Research, Basel, Switzerland.

RESUMEN. El ciclohexapéptido SOM230 es un nuevo análogo de la somatostatina con una elevada afinidad selectiva por cuatro de sus cinco subtipos de receptores, sst1, sst2, sst3 y sst5, especialmente por este último. Para aclarar los mecanismos que subyacen en el efecto dual, estimuladorinhibidor de la somatostatina sobre la liberación de la hormona del crecimiento (GH) en las células adenohipofisarias porcinas en cultivo, analizamos el efecto del SOM230 sobre las mismas, así como sobre las dos subpoblaciones de células somatotropas hipofisarias. Nuestros resultados indican que, en cultivos totales de células adenohipofisarias, el SOM230 provoca una estimulación de la liberación de GH porcina similar, pero no idéntica, a la ejercida por somatostatina. En cambio, su acción tanto sobre la liberación basal de GH como sobre la inducida por GHRH en los cultivos de células somatotropas de alta y baja densidad fue más dispar. En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que los diferentes subtipos de sst contribuyen en distinta medida a la acción dual de la somatostatina sobre las somatotropas porcinas, y que el sst5 debe desempeñar un papel de especial relevancia en dicho efecto.

INTRODUCCIÓN

La secreción de GH por las somatotropas hipofisarias está regulada por una compleja interacción entre dos péptidos hipotalámicos, la hormona liberadora de GH (GHRH) y su contrapartida inhibidora, la somatostatina (1). Junto a éstos, también pueden intervenir en este sistema otros factores de reciente descubrimiento, como la cortistatina, un péptido con una elevada homología estructural con la somatostatina que se une con gran afinidad a sus cinco subtipos de receptores (sst1-5) (2). Nuestro grupo ha demostrado que, al contrario que en otras especies, la somatostatina y la cortistatina ejercen un efecto dual sobre la liberación de GH en las somatotropas porcinas. Así, a dosis elevadas (µM) ambos péptidos inhiben la liberación de GH inducida por GHRH (3), mientras que a bajas dosis (pM) tanto somatostatina como cortistatina estimulan la secreción de GH. De forma similar, análogos sintéticos de la somatostatina como el octreótido o agonistas selectivos para el receptor sst5 pueden inducir la liberación de GH porcina in vitro. Este doble efecto está relacionado con la diferente respuesta a somatostatina que exhiben las dos subpoblaciones de células somatotropas presentes en la hipófisis porcina, que pueden separarse mediante gradientes de densidad. Así, mientras que en las somatotropas de baja densidad (LD) la somatostatina ejerce una respuesta dual dependiente de la dosis, en las somatotropas de alta densidad (HD), tanto altas como bajas dosis de somatostatina activan la liberación de GH (3). Con objeto de investigar los subtipo de receptores sst que median la acción dual de la somatostatina, hemos examinado los efectos del nuevo análogo sintético de la somatostatina SOM230, un ciclohexapéptido metabólicamente estable de tipo multiligando que se une con alta afinidad a

los receptores sst según el siguiente rango sst5>sst3>sst2>sst1, e inhibe la liberación de GH en humanos y ratas (4). En concreto, ensayamos los efectos de SOM230, solo o en combinación con GHRH, sobre la liberación de la GH porcina *in vitro* tanto sobre la población total de células hipofisarias dispersas como sobre las subpoblaciones de somatotropas de alta y baja densidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon cerdas prepúberes (4-6 meses) Large White-Landrace. Las adenohipófisis se extrajeron en un matadero comercial inmediatamente tras el sacrificio de los animales y, una vez en el laboratorio, se dispersaron mediante un protocolo de dispersión enzimático y mecánico. La suspensión de células individuales resultante se centrifugó en un gradiente de densidad hiperbólico continuo de Percoll para separar las dos subpoblaciones de somatotropas porcinas de baja (LD; 1.051-1.064 g/ml) y alta densidad (HD; 1.087-1.098 g/ml), que han sido extensamente caracterizadas en estudios previos (5). Células monodispersas tanto de la población total como de cada subpoblación se cultivaron durante 3-4 días en MEM + 10% FBS a 37°C y 5% CO₂. A continuación, se realizaron los tratamientos experimentales (30 min) en MEM sin FBS. Tras el tratamiento, se recogió el medio de cultivo y su contenido de GH porcina se determinó mediante inmunoensayo enzimático (EIA) (5).

RESULTADOS

El tratamiento de las células adenohipofisarias porcinas en cultivo con dosis crecientes de SOM230 (10⁻²⁰M a 10⁻⁶ M) permitió observar el efecto de este nuevo análogo de la somatostatina sobre la liberación de GH. Los resultados obtenidos muestran una estimulación bifásica, dependiente de la dosis, en respuesta al tratamiento con SOM230. En concreto, los aumentos más elevados en la secreción de GH porcina se alcanzaron a dosis 10⁻¹⁶ y 10⁻⁸ M [271,6 ± 14,2 y 424,2 ± 104,6 % respecto al control (100%), respectivamente]. Evaluamos asimismo el efecto conjunto de dos dosis diferentes de SOM230 (10⁻⁷ y 10⁻¹⁵ M) con una de GHRH (10⁻⁸M) sobre la secreción de GH por las somatotropas porcinas, y observamos que ambas dosis de SOM230 aumentaron de forma aditiva la liberación de GH inducida por GHRH.

Para profundizar en los mecanismos celulares implicados en la respuesta de las células somatotropas al SOM230, analizamos su efecto aislado así como su interacción con GHRH en las subpoblaciones de somatotropas de alta y baja densidad. En somatotropas de alta densidad, una dosis baja de SOM230 (10⁻¹⁵ M) estimuló de forma significativa la liberación basal de GH porcina (182 ± 12.2 % vs. control), mientras que ninguna dosis de SOM230 modificó la liberación de GH inducida por GHRH. En cambio, en somatotropas de baja densidad, el SOM230 (10⁻¹⁵ o 10⁻⁷ M) no modificó la liberación basal de GH e incluso, a altas dosis (10⁻⁷ M), inhibió la liberación de GH inducida por GHRH.

DISCUSIÓN

En este estudio, se analiza por vez primera el complejo efecto del nuevo análogo sintético de la somatostatina SOM230 sobre la actividad secretora de las células somatotropas porcinas en cultivo. En concreto, nuestros resultados muestran que este ciclohexapéptido provoca una estimulación bifásica dosisdependiente sobre la liberación de GH porcina *in vitro* que se asemeja en parte a la estimulación causada por concentraciones bajas (en el rango pM) de los ligandos endógenos somatostatina y cortistatina en estas mismas células. Sin embargo, el hecho de que también dosis altas de SOM230, pero no de somatostatina y cortistatina, estimulen la liberación de GH, demuestra

que una variación en el patrón de selectividad por los distintos sst, como sucede entre los ligandos endógenos y el sintético, puede provocar cambios sustanciales en la respuesta secretora de un tipo celular. Además, nuestros hallazgos sugieren que las acciones causadas por altas y bajas dosis de SOM230 pueden implicar la activación selectiva de distintos conjuntos de receptores, que a su vez, deben diferir del conjunto de sst activados por dosis altas de somatostatina y cortistatina.

Esta idea se refuerza al observar que el SOM230 incrementa de forma aditiva la liberación de GH inducida por GHRH tanto a dosis altas como bajas, acción que contrasta con lo descrito para somatostatina y cortistatina, pues ambas inhiben (a dosis elevadas) el efecto estimulador de la GHRH en estas mismas células. Sin duda, nuestros datos ofrecen pruebas de que el SOM230 activa receptores sst y mecanismos intracelulares específicos y distintivos para regular la liberación de GH. De hecho, a diferencia de somatostatina y cortistatina, SOM230 no estimuló la secreción de GH en somatotropas de baja densidad y solo lo hizo a dosis elevadas en las de alta densidad.

A la vista del rango de afinidades de SOM230 por los sst (sst5>sst2>sst3>sst1) y de las diferencias entre sus acciones y las de somatostatina y cortistatina, cabría pensar que éstas se deben a la incapacidad de SOM230 para unirse al sst4. Sin embargo, datos recientes de nuestro grupo indican que un agonista específico de sst5 estimula la liberación de GH, y que la expresión de sst5 es mayor en células somatotropas de alta densidad que en las de baja densidad. Por ello, el conjunto de nuestros resultados, y especialmente la capacidad de SOM230 para estimular la secreción de GH y, su naturaleza de multiligando y su alta afinidad por sst5, apoyan la idea de que la somatostatina y sus análogos no estimulan la liberación de GH activando un solo sst sino un conjunto de varios ssts interrelacionados, entre los que el sst5 debe desempeñar un destacado papel.

Agradecimientos

Financiación: CVI-139-Junta Andalucía; BFI 2001-2007; BFU2004-03883-MEC.

BIBLIOGRAFÍA

- Muller EE, Locatelli V, Cocchi D 1999 Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiol Rev* 79:511-607.
- 2. de Lecea L, *et al.* 1996 A cortical neuropeptide with neuronal depressant and sleep-modulating properties. *Nature* 381:242-245.
- Ramírez JL, Torronteras R, Castaño JP, Sanchez-Hormigo A, Garrido JC, Garcia-Navarro S, Gracia-Navarro F 1997 Somatostatin plays a dual, stimulatory/inhibitory role in the control of growth hormone secretion by two somatotrope subpopulations from pig pituitary. *J Neuroendocrinol* 9:841-848.
- 4. Weckbecker G, Briner U, Lewis I, Bruns C 2002 SOM230: a new somatostatin peptidomimetic with potent inhibitory effects on the growth hormone/insulin-like growth factor-I axis in rats, primates, and dogs. *Endocrinology* 143:4123-4130.
- Castaño JP, Torronteras R, Ramírez JL, Gribouval A, Sánchez-Hormigo A, Ruiz-Navarro A, Gracia-Navarro F 1996 Somatostatin increases growth hormone (GH) secretion in a subpopulation of porcine somatotropes: evidence for functional and morphological heterogeneity among porcine GH-producing cells. *Endocrinology* 137:129-136.

DISTRIBUTION AND CELLULAR LOCALIZATION OF SEA BREAM ESTROGEN RECEPTORS IN CALCIFIED TISSUES

P.I.S. Pinto, M.D. Estêvão, B. Redruello, D.M. Power, A.V.M. Canário

Centro de Ciências do Mar, Universidade do Algarve. Portugal.

ABSTRACT. In teleost fish, estradiol has been shown to induce calcium mobilization from internal stores, in particular the scales. In the present study, we have localized the estrogen receptor proteins (α , βa and βb) in the scales of juvenile and adult sea bream, using immunohistochemistry with ER isoform-specific antibodies. The ERs co-localized in cells of the scale posterior region that also expressed TRACP, the putative osteoclasts. These results suggest that the calcium mobilising action of estradiol on fish scales is via its direct action on osteoclasts.

INTRODUCTION

Estradiol (E₂) appears to play an important role in the increase of plasma calcium levels that occurs during reproduction in fish. Its hypercalcaemic action is mediated by several different mechanisms, which include increasing whole body calcium influx (1) and also stimulation of calcium mobilisation from internal stores, particularly the scales, where it appears to increase osteoclastic activity (2-4).

The presence of high-affinity estrogen binding sites and of estrogen receptor α (ER α) mRNA in scales (4, 5) suggests that calcium mobilisation is mediated by the direct action of E_2 through binding to its receptor in this tissue, although the contribution, if any, of other calcified tissue is unknown. The mechanism by which E_2 brings about its effect in fish scales remains to be established and information about receptor type and cellular distribution would help resolve this question. The objective of the study was to localize the sea bream ER proteins (sbER α , sbER β a and sbER β b) in scales by immunohistochemistry using ER isoform-specific antibodies.

MATERIAL AND METHODS

Polyclonal antibodies against each ER isoform were generated in rabbit after injection of synthetic peptides corresponding to amino acids of the N- or C-terminal regions of each sbER protein. In order to test the specificity and sensitivity of each antisera, recombinant sbER proteins were produced for 16h at 30°C in the BL21(DE3)pLysS *E. coli* strain, under the control of a T7 promoter (pCR T7/NT-TOPO expression vector) and 0.5 mM IPTG. In Western blot cross-reaction tests, anti-sbER α and anti-sbER β a were highly specific for sbER α and sbER β a recombinant proteins, respectively. In contrast, anti-sbER β b was less specific and cross-reacted with sbER α .

Immunohistochemistry was performed on whole scales of juvenile (50 g) and adult (400 g) sea bream using optimized dilutions of primary (1:500-1:1000) and secondary (anti-rabbit IgG peroxidase conjugate, 1:50) antibodies. Immunoreactive cells were visualized by peroxidase activity using DAB as substrate.

Tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) mRNA which is a marker for osteoblasts in both mammals and fish (3, 6), was detected in whole sea bream scales by *in situ* hybridization overnight at 65°C with a digoxygenin-labelled

antisense TRACP RNA probe and detection with anti-digoxygenin-AP Fab fragments. The substrate for colour detection was NBT/BCIP.

RESULTS AND DISCUSSION

The three sbER proteins α , βa and βb were shown to be expressed in scales from adult and juvenile sea bream (Table 1), using whole mount immunohistochemistry with ER-specific antibodies. However, the signal localization and intensity varied with the age of animals and the type of receptor, suggesting that each ER isoform may have different roles during the fishes' lifetime.

Table 1. Relative expression intensity of estrogen receptor proteins (α , β a and β b) analysed by whole mount immunohistochemistry in the anterior and posterior regions of iuvenile and adult sea bream scales.

Protein	Juvenile sea bream		Adult se	ea bream
	Anterior	Posterior	Anterior	Posterior
ERα	+/-	++	++	+/-
ERβa	+/-	+	+/-	+/-
ERβb	-	++	+/-	+

(-) not detected, (+/-) very low abundance, (+) low abundance and (++) high abundance.

Expression was identified for ER β a in rounded cells near the scale posterior margin in juvenile sea bream and for ER α in isolated cells in the anterior region of adult sea bream scales. In juvenile sea bream, the three sbER proteins were co-expressed in groups of big rounded cells located in the posterior region of the scale. The same type of cell also expresses TRACP mRNA, as detected by *in situ* hybridization, indicating that they are putative osteoclasts.

Previous studies have shown in different species of fish that E_2 treatment increased TRACP activity in scales and promoted the resorption of scale calcium (2, 3, 6, 7). Whether the action of E2 on scales is direct or indirect has not previously been established and although $ER\alpha$ mRNA has been detected in scales, the presence of $Er\beta$ has not been described and receptor translation and localisation have yet to be demonstrated (4, 7). The identification in the present study of the three sbER proteins in different scale cells and in particular the osteoclasts suggests that the calcium mobilizing action of E_2 in scales is via a direct action on these cells, through binding to its receptors.

Acknowledgements

This work was funded by the European Social Fund and National Funds under the project POCTI/CVT/39355/2001 from the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT). PP was funded by the FCT grant POCTI/SFRH/BD/5198/2001; MDE was funded by PRODEP, Programa de Desenvolvimento Educativo para Portugal (medida5/concurso2/acção5.3/2001).

REFERENCES

1. Guerreiro PM, Fuentes J, Canario AVM, Power DM 2002 Calcium balance in sea bream (*Sparus aurata*): the effect of oestradiol-17b. Journal of Endocrinology 173:377-385

- Mugiya Y, Watabe N 1977 Studies on fish scale formation and resorption II.
 Effect of estradiol on calcium homeostasis and skeletal tissue resorption in the goldfish, Carassius auratus, and the killifish, Fundulus heteroclitus.
 Comparative Biochemistry and Physiology 57:197-202
- 3. Persson P, Takagi T, Björnsson BT 1995 Tartrate resistant acid phosphatase as a marker for scale resorption in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effects of estradiol-17ß treatment and refeeding. Fish Physiology and Biochemistry 14:329 339
- Armour KJ, Lehane DB, Pakdel F, et al. 1997 Estrogen receptor mRNA in mineralized tissues of rainbow trout: calcium mobilization by estrogen. FEBS Lett 411:145-8
- Persson P, Shrimpton JM, McCormick SD, Bjornsson BT 2000 The presence of high-affinity, low-capacity estradiol-17beta binding in rainbow trout scale indicates a possible endocrine route for the regulation of scale resorption. Gen Comp Endocrinol 120:35-43
- Suzuki N, Suzuki T, Kurokawa T 2000 Suppression of osteoclastic activities by calcitonin in the scales of goldfish (freshwater teleost) and nibbler fish (seawater teleost). Peptides 21:115-24
- 7. Suzuki N, Hattori A 2002 Melatonin suppresses osteoclastic and osteoblastic activities in the scales of goldfish. Journal of Pineal Research 33:253-258

EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS EXPRESSION IN TELEOST FISH SCALES

M. D. Estêvão and D. M. Power

Centro de Ciências do MAR, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas,8005-139 Faro, Portugal.

ABSTRACT. Fish scales are an important source of calcium which may be mobilized in response to endocrine factors. To better understand this process it is necessary to understand the structure of this tissue. General histological staining methods and *in situ* hybridization were utilized to establish the structural organization of sea bream and tilapia scales. The general architecture of the scale has been characterized and putative osteoblasts and osteoclasts identified in both species.

INTRODUCTION

Calcium is an essential ion for a range of cellular and tissue functions and is strictly controlled (1). Most teleost fish are covered by thin lamellar scales which are of the elasmoid type. The elasmoid scale is composed of three tissue layers, a basal layer, an external layer and a limiting layer (2). The scales represent an important reservoir of calcium which may be mobilized in response to a number of hormones, such as, estrogen and parathyroid hormone related protein (PTHrP) (3). In order to better understand if and how calcium mobilization occurs from scales it is essential to understand the structure and organization of this specialized tissue. In the present study we establish the structural organization and the localization of some extracellular matrix (ECM) proteins in this mineralized tissue.

MATERIAL AND METHODS

Scale morphology in a marine teleost, the sea bream (*Sparus auratus*) and an euryhaline species, tilapia (*Oreochromis mossambicus*) was characterized using histology and *in situ* hybridization. Whole scales of sea bream and tilapia (juvenile and adult) were stained with haematoxylin and eosin, toluidine blue and cartlage-bone double staining, using alizarin red and alcian blue. The mRNA expression of the ECM proteins was determined by whole mount ISH, using digoxigenin-labelled riboprobes which were synthesized using the cloned cDNAs as templates. Hybridization was carried out at 65°C and stringency washes were carried out at the same temperature. The probe concentration used was approximately $3\mu g.ml^{-1}$. The target genes studies were type I collagen, $\alpha 1$ (Col1A1), type V collagen, $\alpha 2$ (Col5A2), fibronectin (FN), osteonectin (OSN), tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) and acidic secreted protein in cartilage (ASPIC).

RESULTS

The scale organization indicates that both sea bream and tilapia scales are of the elasmoid type and are composed of three principal layers. The ratio, scale size:body size was greater in tilapia than in sea bream. Comparison of juvenile and adult scales revealed they had a similar architecture and differed principally in size and abundance of melanocytes which increased with age in both species. Characteristic features of the elasmoid scales, such as the *radii*,

the *circuli* and the focus were identified in both species. The expression patterns of the genes studied by *in situ* hybridization are presented in table I.

Table I. Relative expression intensity of the target genes analysed by whole mount *in situ* hybridization. Results are presented for the anterior (Ant) and posterior (Post) regions of the scales of juvenile and adult sea bream and tilapia.

		,						
Genes		enile bream		dult bream		enile apia		lult ipia
	Ant	Post	Ant	Post	Ant	Post	Ant	Post
Col1A1	+++	+	+++	+	+++	+/-	+++	+/-
Col5A2	+	+	-	+/-	-	-	-	-
FN	+/-	++	+/-	+	-	-	-	-
OSN	+++	+	+++	+	++	+/-	++	+/-
TRACP	+	+	+/-	+/-	-	+/-	-	+
ASPIC	-	-	-	-	-	-	-	-

⁽⁻⁾ not detected, (+/-) very low abundance, (+) low abundance, (++) high abundance and (+++), very high abundance

DISCUSSION

Col1A1 and OSN mRNA are highly expressed in both tilapia and sea bream scales. TRACP is also expressed in both species but with low intensity. Col5A2 and FN were only detected in sea bream scales. ASPIC is not expressed in the scales of either species. The general distribution of the genes studied and the histological staining methods used allowed the identification of putative osteoblasts and osteoclasts in sea bream and tilapia scales of both juvenile and adult animals.

Acknowledgements

The work was funded by the Commission of the European Union, Quality of Life and Management of Living Resources specific RTD programme (FISHCAL, Q5RS-2001-02904). M.D.E. was funded by FCT Grant 2/5.3/Prodep/2001. Our thanks to N. Silva for her support in the lab.

REFERENCES

- 1. Wendelaar Bonga SE, Pang PK.T 1991 Control of calcium regulating hormones in the vertebrates: parathyroid hormone, calcitonin, prolactin and stanniocalcin. *International Review of Citology* 128:139-213.
- Sire JY, Akimenko MA 2004 Scale development in fish: a review, with description of sonic hedgehog (shh) expression in the zebrafish (Danio rerio). International Journal of Developmental Biology 48:233-247.
 Redruello B, Estêvão MD, Rotllant J, Guerreiro PM, Anjos LI, Canario
- Redruello B, Estêvão MD, Rotllant J, Guerreiro PM, Anjos LI, Canario AVM, Power, DM 2005 Isolation and characterization of piscine osteonectin and downregulation of its expression by parathyroid hormone-related protein. *Journal of Bone and Mineral Research* 20:682-692.

A COMPARATIVE STUDY OF PUTATIVE PHEROMONES IN THE REPRODUCTION OF TWO CLOSELY RELATED BLENNIES, Salaria pavo AND S. fluviatilis (Pisces: Blenniidae)

R.M.L. Serrano^{1,2}, E.N. Barata^{1,2}, P.S. Guerreiro², P.C. Hubbard², M.A. Birkett³, J.A. Picket³ and A.V.M. Canário²

¹Department of Biology, University of Évora, Portugal, ²Centre of Marine Sciences, Faro, Portugal, ³Rothamsted Research, Harpenden, UK.

ABSTRACT. Male *Salaria pavo* (marine) develop an androgen-dependent anal gland from the first two rays of the anal fin, which is the source of a putative pheromone that attracts reproductive. Behavioural an electrophysiology studies showed that the putative pheromone of male is multi-component, consisting of water-soluble substances that attract conspecific females in reproductive condition, providing olfactory information related not only to the male's reproductive condition but also with its species.

INTRODUCTION

Salaria pavo is small bottom living fish in the littoral zone of the Mediterranean sea and adjacent Atlantic coast (6). The closely related freshwater species, *S. fluviatilis*, inhabits rivers and lakes in the vicinity of the Mediterranean (2, 3). In both species, the mating system is promiscuous. Males occupy holes or crevices in rocks where females come to spawn and the males subsequently guard the eggs (1, 5). These are good model species in which to investigate specialization in sex pheromone production. The males develop anal glands from the epidermis of the first two rays of the anal fin concurrent with development of the gonads (5). It has previously been shown that the anal gland of *S. pavo* is a source of substances that attract mature females and thereby promote male reproductive success (4). In this study we investigated the olfactory and behavioural responses of females *S. pavo* to putative pheromones of conspecific males and *S. fluviatilis* males.

MATERIAL AND METHODS

The male-related chemical substances (putative pheromones) were extracted by solid phase extraction (SPE; C2/ENV+ sorbents) from water conditioned by: i) males S. pavo and S. fluviatilis with fully developed anal glands; ii) the same males after the anal glands were excised; iii) male S. pavo with partially developed anal glands; iv) the same males after the anal glands were removed. The SPE extracts of water conditioned by males S. pavo with fully and partially developed anal glands, before and after the excision of their anal glands were subjected to reverse-phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC; C18 column; absorption was measured at a wavelength of 254 nm; gradient elution - 100% water 0-3 min, 0-100% methanol 3-28 min, 100% methanol 28-60 min, with this gradient hydrophilic compound elute earlier; fractions were collected each five minutes). Macerates and SPE fractions of fully developed and partially developed anal glands from S. pavo males and macerates and SPE fractions of fully developed anal glands from S. fluviatilis males were also used to extract male related-chemicals. The effect of water conditioned by S. pavo males, before and after excision of the fully developed anal gland, and water conditioned by S. fluviatilis males with fully developed anal gland was assessed in reproductive S. pavo females

using a flow through aquarium. In the same aquarium, reproductive *S. pavo* females were tested in the presence of *S. pavo* and *S. fluviatilis* anal gland macerates and non-reproductive *S. pavo* females were tested in the presence of conspecific anal gland macerates.

RESULTS

Reproductive S. pavo females were attracted to water conditioned by conspecific males with fully developed anal glands but not to water conditioned by the same males after excision of the anal gland or to water conditioned by male S. fluviatilis with fully developed anal glands. Reproductive S. pavo females were attracted to macerates of fully developed anal glands from S. pavo males but not those of S. fluviatilis males. However, non-reproductive S. pavo females were not attracted to macerates of anal glands from S. pavo males. The olfactory potency of each stimulus was tested by recording of the electro-olfactogram (EOG). Water conditioned by male S. pavo and S. fluviatilis with fully developed anal glands had similar olfactory potency and both evoked larger EOG amplitudes than the water conditioned by the same males after excision of the anal gland. Water conditioned by S. pavo males with partially developed anal glands evoked smaller EOG amplitudes than those of water conditioned by male blennies with fully developed anal glands, and after excision of the partially developed anal glands the olfactory potency of the corresponding male-conditioned water was not significantly affected. The three five-minute HPLC fractions eluting between 0-15 minutes (F1-F3) from SPE extracts of water conditioned by males with fully developed anal glands elicited significantly higher EOG amplitudes than the same HPLC fractions from males without. The fraction eluting between 15 and 20 min (F4) also elicited relatively large EOG amplitudes, but no significant differences were found between before and after anal gland excision. Only the HPLC fraction eluting between 10-15 min (F3) from SPE extracts of water conditioned by males with partially developed anal glands elicited significantly higher EOG amplitudes than the same HPLC fraction from males without. Solid-phase extractions macerates of fully developed anal glands from S. pavo and S. fluviatilis males showed similar olfactory potency. The olfactory activity was contained mainly in the extracts and much less so in the filtrates.

DISCUSSION

The behavioural assays with S. pavo females showed that the anal gland of conspecific males is a source of a putative pheromone that attracts females, confirming the results of previous studies (4, 7). The EOG recordings combined with chromatographic techniques showed that S. pavo females are as olfactory sensitive to odorants secreted to the water by fully developed anal glands of conspecific as to the odorants secreted by fully developed anal glands of S. fluviatilis males. In addition, the chemical nature of the odorants secreted to the water by the anal gland of S. pavo males depends on the cellular differentiation stage during the breeding season, since i) hydrophilic odorants (putative pheromones) secreted by the fully developed anal gland are absent in partially developed anal glands; ii) excision of partially developed anal glands did not affect the olfactory potency of water conditioned by males; and iii) water conditioned by males with partially developed anal glands elicited smaller olfactory responses than the water conditioned by males with fully developed anal glands. Also, the odorants secreted to the water by the fully developed anal glands of each blenny species elicited the same olfactory responses. However, the putative pheromone from the fully developed anal glands of conspecific *S. pavo* males is likely to be chemically different from the one secreted by the anal glands of *S. fluviatilis* males, since the odorants released by male *S. fluviatilis* are clearly not attractive to females *S. pavo* (conditioned waters and anal glands macerates). It is also relevant that non-reproductive *S. pavo* females are not attracted to macerated anal glands of conspecific males, supporting the idea that the anal gland is a specialized structure for attracting females in reproductive condition.

Conclusions

Taken together, these results suggest that the putative male pheromone is multi-component, consisting of water-soluble substances that attract conspecific females in reproductive condition, providing olfactory information related not only to the male's reproductive condition but also with its species. This suggests that male blennies are "active signallers" in contrast with known pheromone systems in teleosts.

Acknowledgments

This study was supported by SFRH/BD/6670/2001 and POCTI/BSE/45843/2002 from FCT and CRUP/British Council Grant (14/03 & 90/04).

REFERENCES

- Almada V, Gonçalves EJ, Santos AJ, Baptista C. 1994. Breeding ecology and nest aggregations in a population of Salaria pavo (Pisces: Blenniidae) in an area where nest sites are very scarce. Journal of Fish Biology 45(5):819-830.
- Changeux T, Pont D. 1995. Current status of the river fishes of the french mediterranean basin. Biological Conservation 72:137-158.
- 3. Elvira B. 1995. Conservation status of endemic freshwater fish in Spain. Biological Conservation 72:129-136.
- 4. Laumen J, Pern U, Blum V. 1974. Investigations on the function and hormonal regulation of the anal appendices in Blennius pavo (Risso). Journal of Experimental Zoology 190(1):47-56.
- Patzner RA, Seiwald M, Adlgasser M, Kaurin G. 1986. The reproduction of Blennius pavo. 5. Reproductive behavior in natural environment. Zoologischer Anzeiger 216(5-6):338-350.
- Zander CD. 1986. Blenniidae. In: Whitehead PJP, Bauchot ML, Hureau JC, Nielsen J, Tortonese E, editors. Fishes of the northeastern Atlantic and the Mediterranean. Paris: UNESCO. p 1096-1112.
- Zeeck E, Ide V. The role of sex pheromones in the reproductive behavior of Blennius pavo (Risso). In: Canário AVM, Power D, editors; 1996; Faro. University of Algarve. p 33-38.

EFECTOS DEL CADMIO SOBRE EL CONTENIDO DEL POLIPÉPTIDO ESPECÍFICO DE HEMBRAS VG2 EN HEMOLINFA Y OVARIOS DE *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Heteroptera)

A. Cervera, N. López-Soler, R. Martínez-Pardo, M.D. Garcerá

Dpt. Biologia Funcional i Antropologia Física, Unitat Fisiologia Animal, Universitat de València. España.

RESUMEN. El hallazgo de que el Cd produce una disminución en la tasa de oviposición, fertilidad, tasa de eclosión y fecundidad en el insecto *O. fasciatus* nos llevó al estudio de los posibles efectos de este metal sobre la síntesis del polipéptido vitelogénico VG2 en esta especie. Los resultados obtenidos indican un efecto negativo del Cd sobre la síntesis de VG2 que es dependiente de la dosis de metal administrada.

INTRODUCCIÓN

El cadmio (Cd) es un metal pesado de elevada toxicidad, ampliamente distribuido en el ambiente (1). Los efectos sobre los organismos vivos abarcan desde alteraciones en la liberación de hormonas hipofisarias en vertebrados (2, 3), variaciones en la producción de esteroides gonadales en mamíferos (4), inhibición de la síntesis de vitelogeninas en peces (5) hasta disminución de diferentes parámetros reproductores en insectos (6). Además, en *O. fasciatus* el Cd reduce la producción de las dos vitelogeninas descritas hasta la fecha (7). Recientemente hemos descrito un tercer polipéptido específico de hembras (VG2) en este mismo insecto, por lo que nos preguntamos si el Cd altera también su síntesis.

MATERIAL Y MÉTODOS

<u>Insectos</u>. O. fasciatus procede de una colonia criada en el laboratorio en condiciones estables de humedad, temperatura y fotoperiodo (6).

<u>Bioensayos</u>. Los adultos recién emergidos (10 hembras y 10 machos de 0-24 horas) fueron expuestos a 0, 50, 100 y 200 mg l⁻¹ Cd en el agua de bebida durante 5 días, en botes de vidrio de 500 ml de capacidad y con semillas de girasol como alimento. Tras este tiempo se extrajo la hemolinfa y los ovarios de las hembras tal como se describe en Cervera et al. 2001 (7). Posteriormente los ovarios se clasificaron según Kelly y Davenport (8).

<u>Cuantificación del polipéptido vitelogénico VG2</u>. Las muestras de hemolinfa y ovarios se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (7). Previamente, se ajustó el contenido en proteína total de las muestras a 3 μ g μ l⁻¹. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie, se digitalizaron, y se analizaron para determinar el peso molecular de las bandas (7). El polipéptido vitelogénico se expresa como densidad de la banda en relación a la proteína total.

RESULTADOS

Se estudió el efecto del Cd sobre el polipéptido específico de hembra VG2 en la hemolinfa y ovarios de hembras de 5 días de edad de *O. fasciatus*. En primer lugar se observó que la concentración de proteína total disminuía en las hembras expuestas al Cd (Fig. 1). Con el fin de distinguir un efecto específico del Cd sobre el VG2 de un efecto general sobre la síntesis proteica, las muestras que se sometieron a electroforesis se diluyeron hasta que todas

tuvieron la misma cantidad total de proteína. El Cd produjo una disminución en la cantidad del polipéptido vitelogénico en la hemolinfa de las hembras (Fig. 2), que fue dependiente de la concentración de Cd administrada (R² = 0,833).

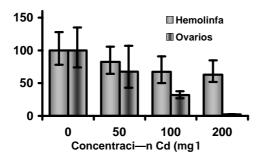
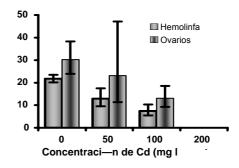


Figura 1. Contenido en proteína total en hemolinfa y ovarios de hembras de *O. fasciatus* tratadas con 0, 50, 100 o 200 mg Γ^1 Cd en el agua de bebida.

La exposición al Cd tuvo el mismo efecto sobre el contenido de VG2 en ovarios que el mostrado sobre la hemolinfa, observándose disminuciones del 24 y 57% para hembras expuestas a 50 y 100 mg l $^{-1}$ Cd, respectivamente (Fig. 2). Además, al igual que ocurría en la hemolinfa, el efecto del Cd fue dependiente de la concentración (R 2 = 0,770).

Figura 2. Densidad de la banda VG2 en hemolinfa y ovarios de hembras de *O. fasciatus* tratadas con 0, 50, 100 o 200 mg Γ^1 Cd en el agua de bebida.



El desarrollo ovárico sufrió un retraso en la maduración, acorde con la disminución del polipéptido vitelogénico VG2, y que también fue dependiente de la concentración (Fig. 3). Además de este retraso se observaron una serie de anomalías en el normal desarrollo de las estructuras reproductoras, que variaron desde ovariolos atrofiados en uno o ambos ovarios hasta oocitos en diferente estado de regresión, incluso a la dosis más baja de Cd administrado.

DISCUSIÓN

Se sabe que el Cd es un inhibidor de la síntesis proteica in vitro (9). En este trabajo se ha observado una disminución en el contenido proteico total en hemolinfa y ovarios de hembras de *O. fasciatus* expuestas al Cd, al igual que ha sido descrito previamente para otras especies de insectos (10, 11). Además, la disminución en la concentración del polipéptido vitelogénico VG2 en hemolinfa y ovarios, dependiente de la concentración de Cd, fue específica para este polipéptido, ya que se observó cuando la densidad de la banda se normalizó a proteína total. Si el Cd tuviera sólo un efecto general sobre la síntesis proteica, afectando por igual a todas las proteínas hemolinfáticas, el patrón de las bandas y su cantidad relativa hubiese sido la misma en todas las carreras, ya que todas contenían la misma cantidad de proteína.

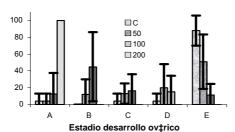


Figura 3. Grado de desarrollo ovárico de hembras de *O. fasciatus* tratadas con 0, 50, 100 o 200 mg l⁻¹ Cd en el agua de bebida. A y B: ovarios previtelogénicos; C, D y E:ovarios vitelogénicos.

Los bajos niveles de VG2 en la hemolinfa de las hembras expuestas al Cd no se deben a un fallo en la vía de secreción de este polipéptido, ya que se ha demostrado que las vitelogeninas no se acumulan en el cuerpo graso en las hembras expuestas (12). Por otro lado, el Cd tampoco parece afectar a la incorporación de la VG2 en los ovarios, ya que si fuera así este polipéptido se acumularía en la hemolinfa, lo que se ha comprobado que tampoco ocurre. Por tanto, nuestros resultados indican que la reducción en los niveles de VG2 en la hemolinfa de hembras expuestas al Cd se puede deber a una inhibición de la síntesis de este polipéptido. De hecho, recientemente se ha publicado el mecanismo por el cual el Cd inhibe la síntesis de Vg en la trucha, a través de la inhibición de la actividad transcripcional del receptor de estradiol, responsable de la síntesis de Vg en el hígado (5). No sabemos si en el caso de O. fasciatus el mecanismo sería similar, ya que no tenemos conocimiento, hasta la fecha de ningún trabajo que aborde los efectos del Cd sobre la vitelogénesis en insectos.

Agradecimientos

A. Cervera agradece la beca predoctoral concedida por la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana. Este trabajo ha sido realizado gracias a los proyectos PB-94-0962 de la DGICYT y GV2001-394 de la Generalitat Valenciana.

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Pacyna, J.M., Scholtz, M.T., Li, Y.F. Environ. Rev. 3: 145-159, 1995.
- Olsson, P.E., Kling, P., Petterson, C., Silversand, C. Biochem. J. 307: 197-203. 1995.
- 3. Smida, A.D., Valderrama, X.P., Agostini, M.C., Furlan, M.A., Chedrese, *J. Biol. Reprod.* 70: 25-31. 2004.
- 4. Stoica, A., Katzenelenbogen, B.S., Martin, M.B. Mol. Endocrinol. 14: 545-553. 2000.
- Le Guével, R., Petit, F.G., Le Goff, P., Métivier, R., Valotaire, Y., Pakdel, F. Biol. Reprod. 63: 259-266. 2000.
- Cervera, A., Maymó, A.C., Sendra, M., Martínez-Pardo, R., Garcerá, M.D. J. Insect Physiol. 50: 737-749. 2004.
- 7. Cervera, A., Maymó, A.C., Martínez, R., Garcerá, M.D. En: *Avances en Endocrinología Comparada*. pp 19-24. Univ. Málaga. 2001.
- 8. Kelly, T.J., Davenport, R. J. Insect Physiol. 22: 1381-1393. 1976.
- 9. Norton, K.B., Kench, J.E. Environm Res. 13: 102-110. 1977.
- 10. Ortel, J. Entomol. Exp. Appl. 59: 93-100. 1991.
- 11. Ortel, J. Comp. Biochem. Physiol. 112C: 291-298. 1995.
- 12. Cervera, A. Tesis Doctoral. Universitat de València. 2005.

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE UN TERCER POLIPÉPTIDO ESPECÍFICO DE HEMBRAS EN HEMOLINFA Y OVARIOS DE *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Heteroptera)

A. Cervera, N. López-Soler, R. Martínez-Pardo, M.D. Garcerá

Dpt. Biologia Funcional i Antropologia Física, Unitat Fisiologia Animal, Universitat de València. España.

RESUMEN. En el presente trabajo se ha identificado un tercer polipéptido específico de hembras en el insecto *O. fasciatus*, no descrito hasta ahora, y cuya síntesis parece estar controlada por la hormona juvenil. El análisis electroforético ha demostrado que dicho polipéptido, con un peso molecular de 172 kDa, se encuentra en la hemolinfa de hembras vitelogénicas y en oocitos vitelogénicos no corionados, pero no en la hemolinfa de machos. Los resultados indican que este tercer polipéptido podría ser una subunidad de las vitelogeninas ya descritas, o podría tratarse de una tercera vitelogenina.

INTRODUCCIÓN

Las vitelogeninas (Vg) de insectos son proteínas que se sintetizan, fundamentalmente, en el cuerpo graso, desde donde se liberan a la hemolinfa para ser incorporadas por los oocitos en desarrollo mediante endocitosis mediada por receptor. Una vez incorporadas, son almacenadas como vitelinas en gránulos citoplasmáticos, proporcionando así el material necesario para el desarrollo embrionario. En el insecto *Oncopeltus fasciatus* se han descrito, hasta la fecha, dos vitelogeninas nativas en la hemolinfa de hembras adultas, Vg A y Vg B (1). Las Vg nativas se separaron en sus subunidades constituyentes, dando un peso molecular de 200 kDa y 68 kDa para las únicas apoproteínas de las Vg A y B, respectivamente (2). Por otro lado, se ha demostrado que, tanto en *O. fasciatus* como en otros heterópteros, la producción de Vg, la maduración ovárica y la deposición de la yema están bajo el control de la hormona juvenil (HJ) (1, 3, 4).

En este trabajo, además de las Vg A y B descritas por otros autores, se ha identificado y cuantificado un tercer polipéptido específico de hembras, al que hemos denominado VG2, en la hemolinfa de hembras adultas de *O. fasciatus*. También se ha investigado si, al igual que ocurre con las Vg A y B, la producción de VG2 está controlada por la HJ.

MATERIAL Y MÉTODOS

<u>Insectos</u>. O. fasciatus procede de una colonia criada en el laboratorio en condiciones estables de humedad, temperatura y fotoperiodo (5).

<u>Bioensayos</u>. Los adultos recién emergidos (0-24 horas) fueron expuestos a los diferentes tratamientos que se describen a continuación. La hemolinfa y los ovarios de las hembras se extrajeron según Cervera et al. (6). Posteriormente, los ovarios se clasificaron según Kelly y Davenport (7).

Experimento 1.- Veinte hembras adultas recién mudadas (0-10 h de edad) se colocaron en placas de petri previamente tratadas con precoceno II (PII) (7,86 µg cm⁻²) durante 42 horas, tras las cuales se devolvieron a sus contenedores, junto con 5 machos. Al cabo de 5 días se extrajo la hemolinfa de las hembras. El PII se utilizó para bloquear la secreción de HJ (8).

Experimento 2 - Para corroborar la acción de la HJ en el control de la vitelogénesis, un grupo de hembras recién mudadas fueron privadas de

alimento, durante 5 días, y a algunas de ellas se las sometió posteriormente a una terapia de sustitución con HJ I (10 µg insecto⁻¹). Dos días más tarde se extrajo la hemolinfa y se comprobó el grado de desarrollo ovárico.

Identificación y cuantificación del polipéptido vitelogénico. Las muestras de hemolinfa y ovarios se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (6). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie, se digitalizaron y se analizaron para determinar el peso molecular de las bandas (6). El polipéptido vitelogénico se expresa como densidad de la banda en relación a la proteína total.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<u>Identificación</u>. Mediante SDS-PAGE se identificaron tres bandas polipéptidicas en la hemolinfa de hembras vitelogénicas, que no se encontraban en la hemolinfa de machos (Fig. 1). Las bandas VG1 y 3, con pesos moleculares de 206±3 y 52±1 kDa se corresponden con las Vg descritas previamente (1, 2) como Vg A y Vg B, respectivamente. Además, se detectó una tercera banda específica de hembras con un peso molecular de 172±3 kDa, a la que denominamos VG2, que también es incorporada selectivamente por los oocitos en desarrollo, al igual que lo son las VG1 y 3, siendo estos tres polipéptidos los únicos constituyentes de los oocitos maduros (Figura 1).

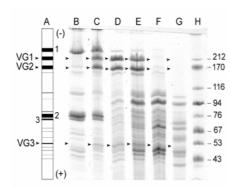


Figura 1. Análisis electroforético de proteínas hemolinfáticas de machos y hembras, y de proteínas de oocitos y huevos maduros. (A) Patrón electroforético de la hemolinfa de hembras. (B) Hemolinfa de machos. (C) Hemolinfa de hembras. (D) Oocitos vitelogénicos (grado C temprano). (E) oocitos vitelogénicos no corionados (grado C tardío). (F) Oocitos maduros corionados (grados D y E). (G) Huevos no fecundados. (H) Marcadores de peso molecular.

Efectos de los tratamientos. Según Martínez y Garcerá (3) y Conill (4), la HJ es la principal hormona que controla la síntesis de Vg en O. fasciatus. Para poder determinar si la VG2 se comporta como una Vg y también es sintetizada bajo la acción de la HJ, se sometió a los insectos a distintos tratamientos. El PIÍ destruye los corpora allata (CA), glándula donde se sintetiza la HJ. No obstante, este compuesto no impidió totalmente la aparición de la VG2 en la hemolinfa de las hembras expuestas (Fig. 2), siendo detectada en tres de las cuatro réplicas realizadas, aunque la densidad de la banda (densidad difusa µg⁻¹) sólo representó el 32% respecto del control. Este resultado indica que los CA están sintetizando HJ y que el tratamiento con PII no ha sido totalmente efectivo. De hecho, se ha descrito que la destrucción del parénquima de las células de los CA depende de su grado de actividad (9); por tanto, es posible que algunas células de los CA de hembras tratadas con PII estén produciendo HJ. Por otro lado, en las hembras privadas de alimento no se detectó la VG2 (Fig. 2), mientras que sus ovarios se mantuvieron en un estado previtelogénico (Fig. 3). No obstante, la aplicación de HJ estimuló la síntesis de VG2 hasta alcanzar niveles similares a los observados en hembras

controles tratadas con HJ. Los ovarios de estas hembras también alcanzaron, en más de la mitad de los casos, el estado vitelogénico. Johansson (10) ya describió que la privación de alimento inactivaba los CA en O. fasciatus. La aparición de la VG2 en hembras privadas de alimento y tratadas con HJ corrobora la teoría de que la falta de polipéptidos vitelogénicos en hembras sin alimentar se debe a la inactivación de los CA, que no pueden producir HJ.

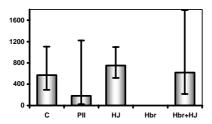


Figura 2. Densidad de la banda VG2 en relación a la cantidad de proteína en hemolinfa de hembras de O. fasciatus controles (C), tratadas con PII (PII) o con HJ (HJ) o privadas de alimento (Hbr) y privadas de alimento y tratadas con HJ (Hbr+HJ).

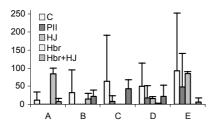


Figura 3. Grado de desarrollo ovárico de hembras de O. fasciatus controles (C), tratadas con PII (PII) o con HJ (HJ) o privadas de alimento (Hbr) y privadas de alimento y tratadas con HJ (Hbr+HJ).

Los resultados aquí descritos sugieren que VG2 podría ser una tercera Vg nativa no detectada por Kelly y Telfer (1) o podría tratarse de una subunidad adicional de la VgA o VgB.

Agradecimientos

A. Cervera agradece la beca predoctoral concedida por la Conselleria de Cultura, Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana. Este trabajo ha sido realizado gracias a los proyectos PB-94-0962 de la DGICYT y GV2001-394 de la Generalitat Valenciana.

BIBLIOGRAFÍA

- 1. Kelly, T.J., Telfer, W.H. Develop. Biol. 61: 58-69. 1977.
- Rankin, M.A., Jäckle, H. J. Insect Physiol. 26:671-684. 1980.
- Martínez, T., Garcerá, M.D. Arch. Insect Biochem. Physiol.6: 49-58. 1987.
- Conill, F. Tesis Doctoral. Universitat de València. 1991.
- 5. Cervera, A., Maymó, A.C., Sendra, M., Martínez-Pardo, R., Garcerá, M.D. J. Insect Physiol. 50: 737-749. 2004.
- 6. Cervera, A., Maymó, A.C., Martínez, R., Garcerá, M.D. En: Avances en Endocrinología Comparada. pp 19-24. Univ. Málaga. 2001.
- Kelly, T.J., Davenport, R. J. Insect Physiol. 22: 1381-1393. 1976.
- Bowers, W.S., Martínez-Pardo, R. Science 197: 1369-1371. 1977.
- Unnithan, G.C., Nair, K.K., Bowers, W.S. J. Insect Physiol. 23: 1081-1094.
- 10. Johansson, A.S. Nytt Magasin for Zoologi 7: 1-132. 1958.

EFFECT OF RETINOIC ACID ON SKELETAL ONTOGENY IN TILAPIA (Oreochromis mossambicus)

Â. Ramos and D.M. Power

CCMar, Universidade do Algarve, Campus de Gambelas, 8005-139 Faro, Portugal.

ABSTRACT. Relatively little is known about the endocrine regulation of skeletal development in fish. Retinoic acid (RA) is a small hydrophobic molecule which behaves in a similar way to steroids and thyroid hormones and functions as a transcription factor. In the present study low doses of RA (1nM) applied to embryos 12-26 hours post fertilisation were shown to generate a number abnormal phenotypes as a consequence of changes in bones of the neurocranium. The present study establishes a model system for studies of endocrine regulation of skeletal ontogeny.

INTRODUCTION

Retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 are steroids which are structurally and functionally different, but which share a common mechanism of action in their target cells. These molecules are hydrophobic and diffuse freely through the plasma membrane. Once inside the cell, they bind to intracellular receptors which activate or repress transcription of target genes, and in this way directly regulate their expression. RA and related compounds (retinoids) are synthesized from vitamin A and play an important role in vertebrate development (1). However, retinoids can also act as potent teratogens and excessive exposure during embryogenesis in mammals and birds causes severe malformations. For example, exposure of late gastrulation-stage rat embryos to retinoid excess has been shown to cause shortening of the preotic hindbrain. Exposure of embryos at later stages than those affecting hindbrain development causes cleft palate and shortening of the facial processes and shortening of the frontnasal and maxillary processes in chick. In Japanese flounder embryos RA treatment also causes facial malformations and can also induce abnormalities in the vertebra and caudal fin, although mortality rates were very high (2). The objective of the present study was to determine if treatment of tilapia embryos with doses of RA (1nM) which do not affect survival rates, can influence skeletal development in juveniles.

MATERIAL AND METHODS

O. mossambicus eggs collected at different stages of development, 4 hours post fertilisation (hpf), 12-14 hpf and 26hpf, were treated with a low dose (1nM) RA for 45 min. After treatment, eggs were rinsed in clean water and incubated in closed circuit aquaria until 12 days post hatch (dph) after which they were fixed in (4% paraformaldehyde). The dose of RA utilised did not significantly increase the mortality rate above that of the control group (table 1). Larvae were subsequently processed for biometry and whole mount skeletal staining (alcian blue/ alizarin red). External morphology, incidence of anomalies and meristic counts were noted for control and experimental groups.

RESULTS

Meristic counts were determined for vertebrates, epurals, hypurals and fin rays. Vertebrate number appeared to be most variable in response to RA treatment, although even in control larvae vertebra number is variable and there is a modal distribution between 29 (12%), 30 (78%) and (10%) 31 vertebrae. In larvae treated with RA, although the numbers of vertebra present were in the same range as the control fish (29-31) there was a higher proportion of larvae with 31 vertebra (31%). Notably, although RA treatment was associated with a tendency for an increase in the number of vertebra this was not associated with an increase in total body length.

Development Stage	Control	RA Treatment
-	Mortality rate (%)	Mortality rate (%)
2 - 4 hpf	30.67	29.71
12 - 14 hpf	20.5	19.45
24 - 26 hpf	25.49	21.37

Table 1 - Mortality rate in each group studied

RA treatment at 2-4 hours post fertilisation (hpf) did not appear to cause a significant rise in abnormalities when compared to the control group. In contrast, RA treatment at 12-14 hpf and 24-26 hpf caused a significant increase in the incidence of abnormalities compared to the controls (figure 1). In larvae treated 12-14 hpf the highest incidence of abnormality was associated with the head and included atrophy of the inferior maxilla, distortion of the facial angle and shortening of the operculum and exposure of the gills. While in larvae treated with RA at 24-26 hpf the most significant effect of treatment was on the head and total body size (figure 1c). In this group the abnormalities were less severe than in the 12-14hpf RA treated group as the only difference appeared to be a flattening of the frontal compared with the control fish.

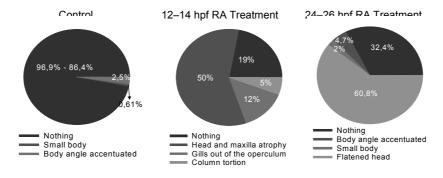


Figure 1. Relative proportion and types of anomalies detected in 12 dph tilapia larvae treated during embryogenesis with RA (1nM). The results for RA treatment of tilapia embryos 2-4 hpf are not presented as they were not significantly different from the control group.

Examination of the skeleton of larvae stained whole mount with alcian blue and alizarin red revealed that RA treatment at 12-14 hpf and 24-26 hpf also caused a change in ossification of the skeleton. The ossification pattern also changes with the RA treatment, and endochondral ossification appeared to be notably advanced in the head compared with the control larvae.

DISCUSSION

The results from the study suggest that tilapia embryos are susceptible to RA applied during embryogenesis and that the consequence of such treatment varies with developmental stage. It would appear that the treatment of embryos between 12-26 hpf with RA even at a low concentration (1nM), interferes with the normal developmental program and also alters skeletogenesis which begins 4-5 dph. Treatment with RA at 12-14 hpf provoked the highest incidence of skeletal abnormalities (67%) which affected principally the anterior region of the fish, the operculum and to a lesser extent the vertebral column. Treatment with RA 24-26hpf also induced a significant increase in skeletal abnormalities and the phenotype obtained was highly reproducible and corresponded almost exclusively to a flattening of the frontal bone (60.8%). The results of the study suggest that changes induced during embryogenesis may have considerable influence on developmental events occurring well after embryogenesis has finished. The way in which RA treatment of tilapia embryos alters skeletal development in larvae remains to be elucidated.

Acknowledgements

This work was financed by CCMAR pluriannual funding from the Portuguese Ministry of Science and Technology (FCT).

REFERENCES

- 1. Cooper, G.(1997). The Cell, A molecular approach. Dana Farber Cancer institute Harvard Medical School. ASM Press. Washington D.C.
- Haga Y., Suzuki T., Takeuchi T., (2002). Retinoic Acid produce malformations in postembryonic development of the japanese flounder, Paralichthys olivaceus. Zoological science, Zoological society of Japan 19: 1105-1112



Α

ACERETE, L., 21, 101 AGULLEIRO, B., 174 ALBALAT, A., 191 ALDEGUNDE, M., 129, 209 ALONSO-GÓMEZ, A.L., 66, 92, 113 ARJONA, F.J., 76, 84, 97, 109, 121 ASTURIANO, J.F., 58, 105

В

BAPTISTA, V.M., 125 BARATA, E.N., 236 BARRIGA, C., 156, 160 BEGTASHI, I., 39 BESSEAU, L., 53 BIRKETT, M.A., 236 BLÁZQUEZ, M., 45 BOEUF, G., 53 BOURAOUI, L., 191 BUCHARLES, C., 80

C

CAAMAÑO, R.I., 209 CALDUCH-GINER, J.A., 33, 204 CAMPINHO, M.A., 117 CANÁRIO, A.V.M., 230, 236 CARDOSO, J., 62, 178, 221 CARRILLO, M., 39, 138, 150 CASTAÑO, J.P., 15, 49, 80, 182, 199, 213, 217, 225 CASTEL, C., 45 CEINOS, R.M., 133, 152, 165, 169 CERDÁ-REVERTER, J.M., 39 CERVERA, A., 27, 240, 245 CHAVES POZO, E., 76 CHISTYAKOVA, O., 187 CODINA, M., 187, 195 CONFENTE, F., 141 CRUZ-GARCÍA, D., 49 CULLER, M.D., 182

D

DE PEDRO, N., 66, 92 DE VET, E., 62 DELGADO, M.J., 66, 92, 113 DIÉGUEZ, D., 15 DURÁN-PRADO, M., 80, 199, 213

Ε

ELBAL, M.T., 174 ELGAR, G., 62 ESTÊVÃO, M.D., 230, 234

F

FALCÓN, J., 53, 66 FELIP, A., 39 FERNÁNDEZ-DURÁN, B., 133 FLIK, G., 84

G

GABILLARD, J.C., 195 GAHETE, M.D., 217 GARCERÁ, M.D., 27, 240, 245 GARCÍA AYALA, A., 76 GARCÍA DE LA SERRANA, D., 187 GARCÍA HERNÁNDEZ, M.P., 174 GARCÍA-LÓPEZ, A., 76, 88, 121 GARCÍA-NAVARRO, S., 80, 182 GARZÓN, D.L., 58, 105 GESTO, M., 133, 152, 165, 169 GÓMEZ, A., 138, 150 GONZÁLEZ DE CANALES, M.L., 141 GONZÁLEZ SARRÍAS, A., 174 GONZÁLEZ, B.J., 80 GRACIA-NAVARRO, F., 15, 199 GUERREIRO, P.S., 236 GUIJARRO, A.I., 66, 113 GUTIÉRREZ, J., 187, 191, 195 GUTIÉRREZ-PASCUAL, E., 213

Н

HERRERA, P., 53, 71 HUBBARD, P.C., 236

ı

ISORNA, E., 66, 92, 113

J

JOVER, M., 58, 105

Κ

KINEMAN, R.D., 217 KLAREN, P., 84 KLUSSMANN, S., 182

L

LAIZ-CARRIÓN, R., 84 LIARTE, C., 21 LÓPEZ-OLMEDA, J.F., 71 LÓPEZ-PATIÑO, M.A., 66, 113 LÓPEZ-SOLER, N., 27, 240, 245 LOURO, B.P., 146 LOZANO, M.P., 174 LUQUE, R.M., 217, 225

MACKENZIE, S., 21, 101 MALAGÓN, M.M., 15, 49, 80, 182, 199, 213, 217, 225 MAÑANÓS, E., 39 MANCEBO, M., 129, 209 MANCERA, J.M., 76, 84, 97, 109, 121 MARTÍN DEL RÍO, M.P., 84, 97, 109, 121 MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.M., 92 MARTÍNEZ-FUENTES, A.J., 15, 199, 213, 225 MARTÍNEZ-PARDO, R., 27, 240, 245 MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G., 76, 88, 121 MESEGUER, J., 76 MÍGUEZ, J.M., 97, 109, 133, 152, 165, 169 MOLÉS, G., 39, 150 MOLINA, M., 199 MONTSERRAT, N., 187 MULERO, V., 76 MUÑOZ-CUETO, J.A., 53, 71, 141 MURIACH, B., 39

Ν

NAVARRO, I., 187, 191, 195 NAVARRO-MARTÍN, L., 45

PAREDES, S.D., 156, 160 PEÑARANDA, D.S., 58, 105 PEREZ, J.J., 129, 209 PÉREZ, L., 58, 105 PÉREZ-SÁNCHEZ, J., 33, 204 PICKET, J.A., 236 PIFERRER, F., 45 PINTO, P.I.S., 230 PINTO, V., 221 POLAKOF, S., 97, 109, 121 POWER, D.M., 62, 117, 125, 146, 178, 221, 230, 234, 250 RALLIÈRE, C., 195 RAMOS, Â., 250 REDRUELLO, B., 230 RENDÓN, M.C., 141 RESCAN, P.Y., 195 RHODES, S.J., 80 ROCHA, A., 138, 150 RODRÍGUEZ, A.B., 156, 160 RODRÍGUEZ, L., 39, 209 RODRÍGUEZ-ILLAMOLA, A., 133, 152, 165 RODRÍGUEZ-PACHECO, F., 15, 182, 213 ROZAS, G., 129

S

SAERA-VILA, A., 33, 204 SÁNCHEZ-GURMACHES, J., 191 SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., 71 SANGIAO-ALVARELLOS, S., 97, 109, 121, 152, 169 SARASQUETE, C., 88 SAUZET, S., 53 SCHMID, H.A., 225 SERRANO, R.M.L., 236 SERVILI, A., 71 SILVA, N., 117, 125 SOENGAS, J.L., 97, 109, 121, 133, 152, 165, 169 SWEENEY, G.E., 117

Т

TENA-SEMPERE, M., 213 TERRÓN, M.P., 156, 160 TINTOS, A., 165, 169 TORT, L., 21, 101 TOVAR, S., 15

٧

VALERO, V., 156, 160 VARGAS-CHACOFF, L., 76, 84 VAUDRY, H., 80 VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, R., 15, 49, 80 VICENTE, J.S., 58 VIEIRA, F., 178 VIUDES DE CASTRO, M.P., 58

Z

ZANUY, S., 39, 138, 150