

**ACTIVIDAD CITOCROMO P450
AROMATASA EN LA LUBINA
(*Dicentrarchus labrax* L.)**

Alicia González Cabeza

TESIS DOCTORAL

**Universitat de Barcelona
Departament de Fisiologia
Barcelona 2003**

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

ACTIVIDAD CITOCROMO P450
AROMATASA EN LA LUBINA
(Dicentrarchus labrax L.)

Memoria presentada por Alicia González Cabeza
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Alicia González Cabeza

La presente investigación ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Francesc Piferrer Circuns, científico titular del C.S.I.C. en el Institut de Ciències del Mar, en Barcelona. Adscrita al Departament de Fisiologia, Facultat de Biologia de la Divisió III de la Universitat de Barcelona (bieni 1998-2000). Tutor: Dr. Miquel Riera.

Dr. Francesc Piferrer Circuns

¿Por qué esta magnífica tecnología científica, que ahorra trabajo y nos hace la vida más fácil, nos aporta tan poca felicidad? La respuesta es, simplemente, porque aún no hemos aprendido a usarla con tino.

Albert Einstein

La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda.

François Voltaire

A mis padres

A Pedro

AGRADECIMIENTOS

Llegada la hora de los agradecimientos, comenzaré por agradecer al Dr. Francesc Piferrer la oportunidad que me brindó al poder realizar esta tesis bajo su dirección. También destacar su constante supervisión y su capacidad para enseñarme lo riguroso que uno debe ser haciendo ciencia, así como su facultad para reconocer también las cosas bien hechas. Además gracias a él pude visitar laboratorios y países que nunca hubiese imaginado.

No puedo olvidarme de los consejos y sugerencias del Dr. Félix Bustó, quien nos ayudó en comprender la cinética e inhibición enzimática, que es todo un mundo. Igualmente, agradecer al Dr. Francisco Prat y a Lucinda Rodríguez sus sabios consejos sobre RIA. Del mismo modo, el Dr. Adelino Canario me ayudó no sólo con la TLC sino que me acogió en su laboratorio para enseñarme sus técnicas de biología molecular, que sin la sufrida Rute no hubiese sido posible aprender. También, como experto en esteroides, no me puedo olvidar de agradecer al Dr. David Kime sus sugerencias y conocimientos sobre ELISA y la paciencia de Katrien por soportar mi primer contacto con anglosajones y ayudarme no sólo científica sino personalmente. Y para terminar con las estancias en el extranjero, no tengo bastantes palabras para agradecer a la Dra. Gloria Callard su hospitalidad, sabiduría y generosidad por recibirme dos años consecutivos en su laboratorio y tratarme como a una hija. Por supuesto que en mis agradecimientos hacia los compañeros de Boston no puedo pasar por alto la paciencia de Mitsuyo en el laboratorio y su amistad fuera del mismo, así como al resto de compañeros que hicieron mi vida social más amena: Chun-Hua, Noemí, Paula, Lek, Joe, San-Jei y Apo.

En cuanto a la logística, no me puedo olvidar que sin la ayuda de Jordi Carreras, el Dr. Antonio Mateos, el Aquàrium de Barcelona (sobre todo Patrici Bultó y Coral Hispano), Blanes Peix y el Dr. Joan Cerdá, no hubiese podido contar con los cientos de lubinas que he necesitado a lo largo de estos cinco años. En especial, me gustaría mencionar que sin la ayuda de los pescadores de Blanes Peix todavía estaría en una jaula intentado pescar una lubina, y que su simpatía hizo que las pescas y mareos matutinos fuesen más llevaderos. También agradecer la experiencia de la Dra. Pepita Casas con las sangrías de los conejos, sin la cual no tendríamos nuestro anticuerpo de estradiol. Y para finalizar con los agradecimientos de muestras, mencionar la generosidad de la Dra. Francina Munell por proporcionarnos esas muestras tan codiciadas de tejidos tumorales.

En cuanto a mis compañeros de trabajo, empezaré por la administración, agradeciendo a Justo y Jordi su profesionalidad y buen trato, así como la comprensión y paciencia de las dos Evas. Al resto del personal, por supuesto, le agradezco que siempre estuviese ahí cuando les necesité. No quiero olvidarme de Rita Arias, que en su momento me animó, junto a Isabel Palomera, a continuar con mi tesis. A las dos, GRACIAS. En cuanto al Departamento de Recursos Marinos, que ha sido el mío, agradecer a todos sus miembros que, aún viéndome como un bicho raro entrando al laboratorio de radiactividad y corriendo de arriba para abajo con bata y tubos pequeños, siempre me hicieron sentir como en casa, debido al número y

calidad de las horas que he compartido con ellos. Mencionaré que mantengo una buena relación con todos los compañeros de despacho que he tenido a pesar de soportar mis humos del tabaco: Patrick, por ofrecerme su punto de vista alemán; Gabriel, por su paciencia con la burocracia española; y Pere, por su sencillez. Con los que más trato he compartido, tendría muchas cosas que agradecer pero destacaré de Balbina su amistad y su misma opinión de la ciencia que yo; de Javi su amistad y, aunque fallido, su intento por corregir mi vocabulario (es único); de Mer su amistad y porque cuando yo voy ella vuelve, lo que se agradece aunque sólo haya sido durante casi dos años y sin ánimo de lucro alguno. Aunque con Elvira no he compartido despacho, puedo agradecerle su amistad, además de su ayuda logística tanto piscícola como gastronómica. A pesar de que con Ignacio no compartí mas que unos días de despacho no puedo olvidar que fuera de él tuvo que soportar mis primeros pasos en Barcelona, que aunque difíciles hizo que no lo parecieran tanto con su apoyo. Y por supuesto, agradecer a Guio su apoyo dentro del laboratorio, ya que fue mi primera compañera de batalla y, como no, su amistad fuera del trabajo. No quiero olvidarme del resto de compañeros del Instituto. En primer lugar, agradecer al departamento de Biología Marina su apoyo logístico de laboratorios e intercambio de reactivos cuando los he necesitado, así como su ayuda a nivel experimental (Elisa, Sergi, Bea, Ramón y Vanessa, entre otros), y a Jordi Felipe por compartir muchas horas en el laboratorio de radiactividad cuando éramos los únicos que lo usábamos. Del Departamento de Geología, me quedo con los precarios: Graziella, Ana, Enrique, Mohammed y Pere por compartir situaciones similares. Igualmente, a los compañeros de Recursos, y en especial a los precarios: Anna, Jacopo, Hugo y a las nuevas generaciones: Joan, José Antonio, Borja y Belén. Y como no, a los contertulianos del primer turno del comedor: Maribel, Josep Mari, Chino y Rusky.

Sin olvidarme del otro extremo de los Pirineos, quisiera agradecer a la peña Landabeko que, sin entender muy bien lo que hacia en Barcelona, me han mantenido los pies en la tierra o, dicho de otra manera, hicieron que no perdiese MI NORTE. Además me hicieron recordar, durante mis visitas a casa, que el “poteo” sigue existiendo. Y hablando de casas, tengo que agradecer que pese a los momentos no muy gratos vividos con Ana, hemos hecho junto a Xevi una pequeña “familia”. Gracias por escucharme y soportarme en los buenos y malos momentos, así como por compartir algo más que un piso.

Finalmente, los agradecimientos más sentidos para mis padres, sin los cuales no hubiese podido hacer realidad esta tesis y reconocer que la dedicatoria de la misma no significa ni un uno por ciento de todo lo que tendría que hacer para agradecer su incondicional apoyo. Del mismo modo quiero agradecer el ánimo infundido por el resto de mi familia, aunque fuese por teléfono. Y si el apoyo de unos padres es más o menos comprensible, el corazón de Pedro no tiene límites. Esto es amor y lo demás son cuentos chinos.

Para terminar, simplemente mencionar que los que me conocen ya saben que me gustan más los hechos que las palabras y probablemente me haya quedado corta agradeciendo, pero lo hice como lo sentí y espero que sepan perdonarme. Y si me he dejado a alguien que considera que debe estar en este apartado le ruego que me disculpe.

ÍNDICE

Agradecimientos	i
Índice	iii
Presentación	ix

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Aromatasa

Los esteroides sexuales	3
El complejo enzimático P450 aromatasa	3
El proceso de aromatización de los esteroides sexuales	8
Isoformas del gen de la aromatasa	9
Distribución subcelular de la aromatasa	10
Distribución anatómica de la aromatasa	10
Distribución neuroanatómica de la aromatasa	12
Funciones de los neuroestrógenos	13
Presencia de actividad aromatasa en vertebrados	14
Regulación de la actividad aromatasa	14
Métodos de determinación de la actividad aromatasa	16
Inhibición enzimática	19

Esteroides sexuales y aromatasa en el ciclo reproductor de los peces

Eje cerebro-hipófisis-gónada	22
Determinación sexual	23
Esteroides sexuales y diferenciación sexual	25
Función de los andrógenos 11 β -hidroxilados	27
Función de la aromatasa en la diferenciación sexual	28
Efectos ambientales sobre la actividad aromatasa	29

Actividad aromatasas y receptores de esteroides sexuales	30
Rol de la aromatasas en el ciclo ovárico durante la vitelogenesis y maduración final	31
<u>La lubina</u>	
Taxonomía y hábitat	32
Fisiología del desarrollo y reproducción	33
<u>Objetivos</u>	37

CAPÍTULO II. CHARACTERIZATION OF AROMATASE ACTIVITY IN THE SEA BASS EFFECTS OF TEMPERATURE AND DIFFERENT CATALYTIC PROPERTIES OF BRAIN AND OVARIAN HOMOGENATES AND MICROSOMES

Abstract	41
Introduction	42
Materials and methods	45
Fish	45
Radioisotopes and reagents	45
Aromatase assay	46
Protein determination	47
Data analysis	47
Results	48
Effect of pH of buffer, temperature of incubation and strength of assay buffer	48
Effect of amount of tissue and time of incubation	49
Validation of the method	50
Concentration of cofactor	51

Assay specificity and accuracy	53
Subcellular localization	54
Effect of substrate	56
Application of aromatase assay	57
Discussion	58
Acknowledgements	61
Literature cited	61

**CAPÍTULO III. AROMATASE ACTIVITY IN THE EUROPEAN SEA BASS
(*Dicentrarchus labrax* L.) BRAIN. DISTRIBUTION AND CHANGES IN
RELATION TO AGE, SEX, AND THE ANNUAL REPRODUCTIVE CYCLE**

Abstract	71
Introduction	72
Materials and methods	73
Fish	73
Radioisotopes and reagents	74
Aromatase assay	74
Plasma levels of sex steroids	75
Data analysis	76
Results	76
Tissue distribution	76
Distribution in the different brain areas	77
Changes with age	80
Changes with the annual reproductive cycle	80
Discussion	82
Acknowledgements	87

References	87
------------------	----

CAPÍTULO IV. INHIBITION OF SEA BASS BRAIN AND OVARIAN AROMATASE ACTIVITY BY 11 β -HYDROXYANDROSTENEDIONE BUT NOT BY 11 β -HYDROXYTESTOSTERONE

Abstract	99
Introduction	100
Materials and methods	102
Fish	102
Radioisotopes and reagents	103
Aromatase assay	103
Data analysis	104
Results	105
Androstenedione metabolism	106
11 β -OH Δ^4 effects on brain aromatase activity	107
Inhibition type and constant (K_i) in brain	109
11 β -OH Δ^4 effects on ovarian aromatase activity	111
Inhibition type and constant (K_i) in ovary	112
Reversibility	113
Discussion	114
Acknowledgements	117
Literature cited	117

CAPÍTULO V. SEX-RELATED DIFFERENCES IN THE ONTOGENY OF BRAIN AND GONADAL AROMATASE ACTIVITY DURING THE FIRST YEAR OF LIFE IN THE SEA BASS (*Dicentrarchus labrax*)

Abstract	127
Introduction	128
Materials y methods	129
Fish and rearing conditions	129
Production of male-dominant and female-dominant groups of sea bass	130
Sampling	131
Aromatase assay	131
Data analysis	132
Results	132
Discussion	141
Acknowledgements	144
References	144

CAPITULO VI. DISCUSIÓN GENERAL

Dos isoformas diferentes en cerebro y ovario	151
Diferencias en actividad aromatasa entre cerebros de machos y hembras	153
Distribución de la actividad aromatasa	155
Inhibición endógena	156
Efectos de la temperatura. Posibilidad de ESD en lubina mediada por actividad aromatasa	161
Diferencias en la actividad aromatasa durante el desarrollo. Aromatasa y diferenciación sexual	163

CONCLUSIONES	169
BIBLIOGRAFÍA	175
RESUMEN	213

PRESENTACIÓN

Este trabajo se ha llevado a cabo en el Departamento de Recursos Marinos Renovables del Instituto de Ciencias del Mar (CSIC), bajo la dirección del Dr. Francesc Piferrer. La investigación realizada ha sido financiada por los siguientes proyectos de investigación: “Caracterización de los receptores de esteroides sexuales y de la actividad aromatasa en la lubina (*Dicentrarchus labrax*)” (Proyecto CICYT MAR96-1860, del Ministerio de Educación y Ciencia); y “Improving production efficiency of sea bass farming by developing methodologies to eliminate environmental androgenesis (PROBASS)” (Proyecto Q5RS-2000-31365, del V Programa Marco de la UE). El Ministerio de Ciencia y Tecnología subvencionó una beca FPI durante los años 1998-2001 y el citado proyecto europeo el resto del periodo empleado en la realización de la tesis.

Además de las investigaciones realizadas en España, el Ministerio de Ciencia y Tecnología financió estancias en el extranjero para la formación en técnicas complementarias al estudio objeto de esta tesis. Bajo la dirección del Dr. David Kime del Department of Animal and Plant Sciences (Sheffield University, Reino Unido), se aprendió durante cuatro semanas la técnica de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) para medir niveles plasmáticos de esteroides. En el Department of Biology (Boston University, Estados Unidos), y bajo la dirección de la Dra. Gloria Callard durante dos estancias de diez semanas cada una, se estudiaron técnicas de biología molecular que actualmente se continúan en nuestro laboratorio, relacionadas con marcadores de células germinales. Finalmente, una estancia de un mes y medio en el Departamento de Ciências do Mar e do Ambiente, Universidade do Algarve (Faro, Portugal), bajo la dirección del Dr. Adelino Canario, y subvencionada por la Acción Integrada: “Control ambiental y mecanismos moleculares de la diferenciación sexual en la lubina (*Dicentrarchus labrax*)”, (Proyecto HP-1998-0041, del Ministerio de Educación y Ciencia), sirvió para generar una

genoteca de cDNA de riñón anterior de lubina y obtener una sonda de cDNA del enzima 11β -hidroxilasa, cuyo estudio continúa en el marco del proyecto europeo mencionado anteriormente.

Los resultados obtenidos durante la realización de esta investigación se han presentado en los siguientes congresos:

Piferrer, F., G. Rotllant, **A. González**. Determinación sexual y desarrollo gonadal en peces teleósteos. Congreso constituyente de la Asociación Ibérica de Endocrinología Comparada. Peñíscola (Castellón); 15-18 de Abril de 1998.

González, A., F. Piferrer. Characterization of cytochrome P450 aromatase enzyme activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. Bergen (Noruega); 3-9 de Julio de 1999.

González, A., F. Piferrer. Characterization of cytochrome P450 aromatase enzyme activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) brain. 26th New England Endocrine Conference, University of Rhode Island Narragansett. Rhode Island (EE.UU.); 13 de Noviembre de 1999.

González, A., F. Piferrer. Cytochrome P450 aromatase enzyme activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). 20th Conference of the European Society for Comparative Endocrinology. Faro (Portugal); 5-9 de Septiembre de 2000.

González, A., F. Piferrer. Actividad aromatasa (AA) en el eje cerebro-gónada durante el desarrollo y reproducción de la lubina (*Dicentrarchus labrax*). VII Jornada de la Secció de Biologia de la Reproducció, de la Societat Catalana de Biología. Barcelona; 20 de Junio de 2001.

González, A., F. Piferrer. Actividad P450 aromatasas (Estrógeno sintetasa) en la lubina (*Dicentrarchus Labrax* L.) III Congreso de la Asociación Ibérica de Endocrinología Comparada. Torre del Mar (Málaga); 8-10 de Octubre de 2001.

González, A., F. Piferrer. Androgen-dependent inhibition of aromatase activity in the brain and ovary of a teleost fish (*Dicentrarchus labrax*). 21th Conference of European Comparative Endocrinologists. Bonn (Alemania); 26-30 de Agosto de 2002.

Asimismo, los resultados obtenidos se han organizado en los siguientes artículos originales de investigación, ya publicados o en vías de su publicación:

González, A., F. Piferrer. (1999). Cytochrome P450 aromatase enzyme activity and reproduction in teleost fish: Studies in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). En B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson and S.O. Stefansson. (Eds.) Reproductive Physiology of Fish, vol. 6. pp. 39-42. Publ. Univ. Bergen, Bergen. ISBN: 82-7461-048-2.

González, A., F. Piferrer. (2002). Characterization of aromatase activity in the sea bass: Effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *Journal of Experimental Zoology* 293: 500-510.

González, A., F. Piferrer. (2003). Aromatase activity in the European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) brain: Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* (En prensa).

González, A., F. Piferrer. (2003). Inhibition of sea bass brain and ovarian aromatase activity by 11 β -hydroxyandrostenedione but not by 11 β -hydroxytestosterone. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. (En consideración).

González, A., M. Papdaki, C. Mylonas, F. Piferrer. (2003). Sex-related differences in the ontogeny of brain and gonadal aromatase activity during the first year of life in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). (En preparación).

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Aromatasa

Los esteroides sexuales

Las hormonas esteroideas: esteroides sexuales, mineralocorticoides y corticosteroides, se forman a partir del colesterol como precursor (Fig. 1). Los esteroides sexuales comprenden los andrógenos, estrógenos y progestágenos. La aromatasa es el enzima responsable de la conversión de andrógenos (testosterona y androstenediona, fundamentalmente) en estrógenos (estradiol y estrona, respectivamente), hormonas esteroideas sexuales formadas al final de la ruta esteroidogénica (Fig. 2). Los andrógenos y estrógenos formados por 19 y 18 átomos de carbono, respectivamente, junto con los progestágenos, de 21 átomos de carbono, son los esteroides esenciales para el control endocrino de la reproducción en vertebrados. Prácticamente influyen en todos los aspectos de establecimiento y mantenimiento del género. De hecho, el desarrollo reproductivo no se llevaría a cabo correctamente en ausencia de estos esteroides o de sus receptores (Conley y Walters, 1999).

El complejo enzimático P450 aromatasa

La biosíntesis de estrógenos está catalizada por un miembro de la superfamilia de citocromos P450, denominado citocromo P450 aromatasa. Dicha superfamilia está compuesta por más de 480 miembros repartidos en 74 familias, de las cuales la P450 aromatasa es el único miembro de la familia 19 (Nelson et al., 1996) dentro del subgrupo de hidroxilasas de esteroides, con una mayor especificidad catalítica por el metabolismo de esteroides que otros citocromos P450. El complejo catalíticamente activo está compuesto por una aromatasa citocromo P450 (P450arom), que se une al sustrato, y acoplada a ella una flavoproteína, la adenina dinucleótido fosfato (NADPH)-citocromo

P450 reductasa (reductasa), que facilita el flujo de electrones necesarios para la oxidación del sustrato (Conley y Walters, 1999).

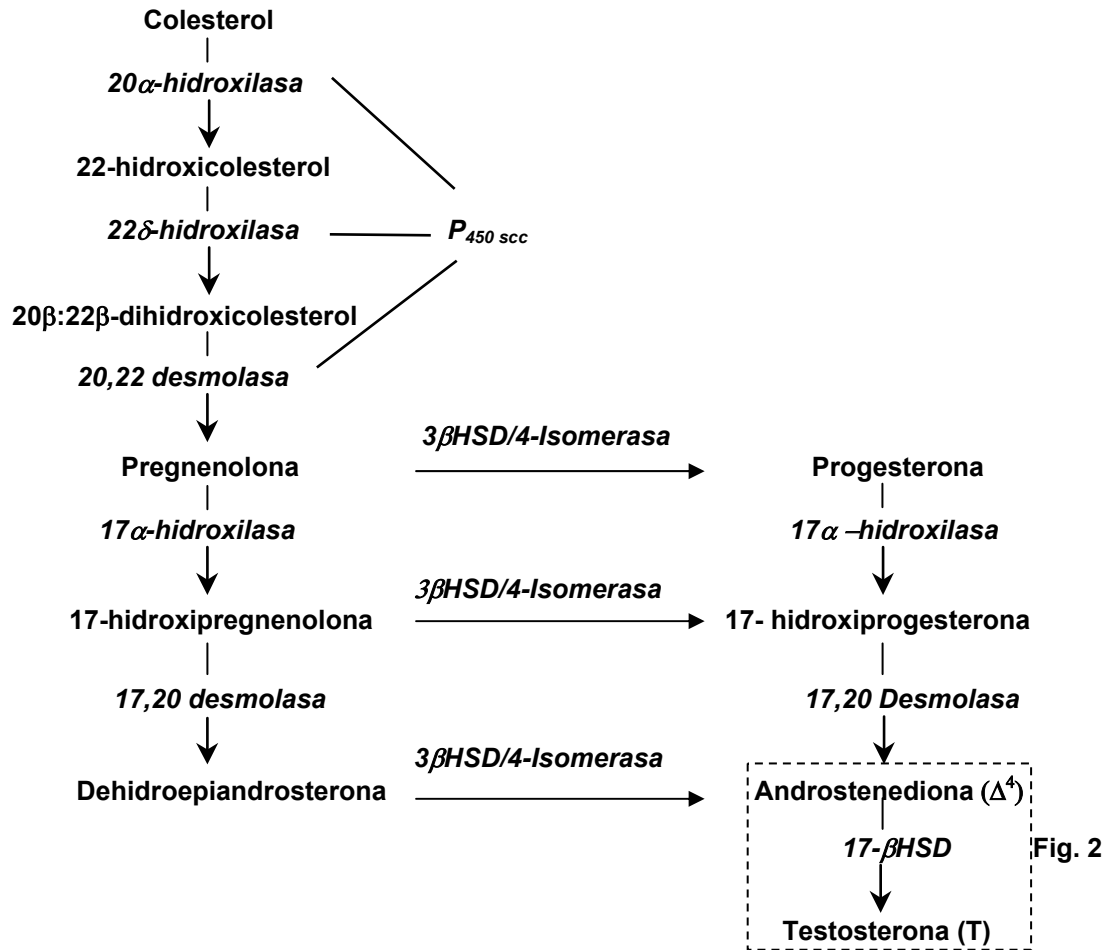


Fig. 1. Ruta de biosíntesis de hormonas esteroideas. El colesterol es el precursor de los esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos y progestágenos), de los mineralocorticoides y de los corticosteroides. Las hormonas esteroideas consisten de una serie de anillos de carbono, siendo el núcleo ciclopentano perhidrofenantreno la unidad básica.

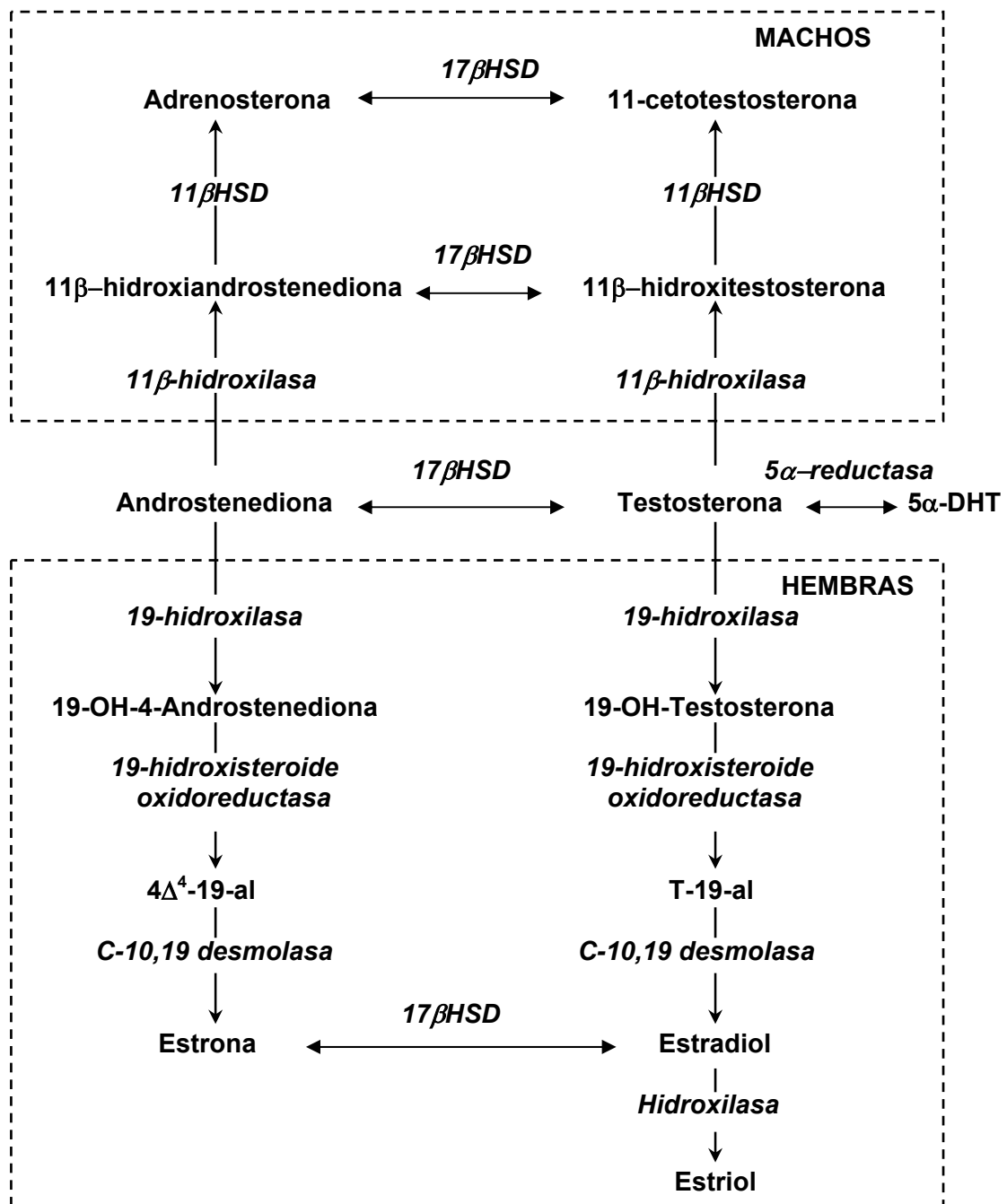


Fig. 2. Representación esquemática de la ruta esteroidogénica propuesta para la diferenciación sexual gonadal en peces. Las líneas guionadas indican que los estrógenos son los responsables de la diferenciación sexual femenina y los 11β-hidroxi-andrógenos de la masculina. 11β- y 17β-HSD = 11β- y 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, respectivamente. Modificado de Baroiller et al., 1999.

Además de las monooxigenasas (catalizan la inserción de uno de los átomos del oxígeno molecular en el sustrato orgánico; el otro átomo se reduce a agua) y dioxigenasas (catalizan la inserción de los dos átomos de oxígeno del oxígeno molecular en el sustrato orgánico) los tejidos animales utilizan otros sistemas enzimáticos para hidroxilar. Estos sistemas de transporte electrónico unidos a membrana se encuentran en el retículo endoplasmático (RE), es decir, en la fracción microsómica tras la homogenización. En el hígado, por ejemplo, se puede encontrar uno de estos sistemas microsómicos de transporte electrónico compuesto por una flavoproteína llamada NADPH-citocromo-P450-reductasa, y un citocromo microsómico especializado, el citocromo P450, designado frecuentemente como P450; en algunos organismos, participa también una proteína ferro-sulfurada (Lehninger et al., 1993). En la primera etapa, un equivalente electrónico es transferido desde el NADPH a la forma semiquinona de la flavoproteína, a la que reduce por completo. Los electrones se transfieren desde la flavoproteína reducida a la forma oxidada, o Fe(III), del citocromo P450, que se encuentra solamente en los microsomas de las células hepáticas, y se halla ausente en las mitocondrias del hígado; posee una banda α a 420 nm y es un citocromo de la clase B. El citocromo P450 (P de pigmento) se identificó por primera vez gracias a que el derivado con monóxido de carbono de su forma reducida presenta un máximo de absorción a 450 nm. La forma reducida, Fe(II), del citocromo P450 reacciona con el oxígeno molecular, de forma que uno de los átomos de oxígeno se reduce a agua y el otro se introduce en el sustrato orgánico (Lehninger et al., 1993).

El citocromo P450 aromatasa está altamente conservado en todos los vertebrados y especialmente en mamíferos. El gen que codifica para esta proteína es el *Cyp19* y dependiendo del tejido y especie, la aromatasa posee entre 490 y 525 aa (Chang et al., 1997; Cruz y Canario, 2000) y un peso molecular de ~55000 daltons. De hecho, entre la secuencia peptídica de mamíferos y la de peces existe de 50 a 90% de homología (Conley y Hinshelwood, 2001). A nivel genómico entre el gen humano (Simpson *et al.*, 1994) y el

de medaka (Tanaka *et al.*, 1995), los límites de exón-intrón son prácticamente idénticos. Igualmente ocurre con la similitud de la flavoproteína, NADPH-citocromo-P450-reductasa, entre mamíferos y la trucha con un 76% (Porter, 1991).

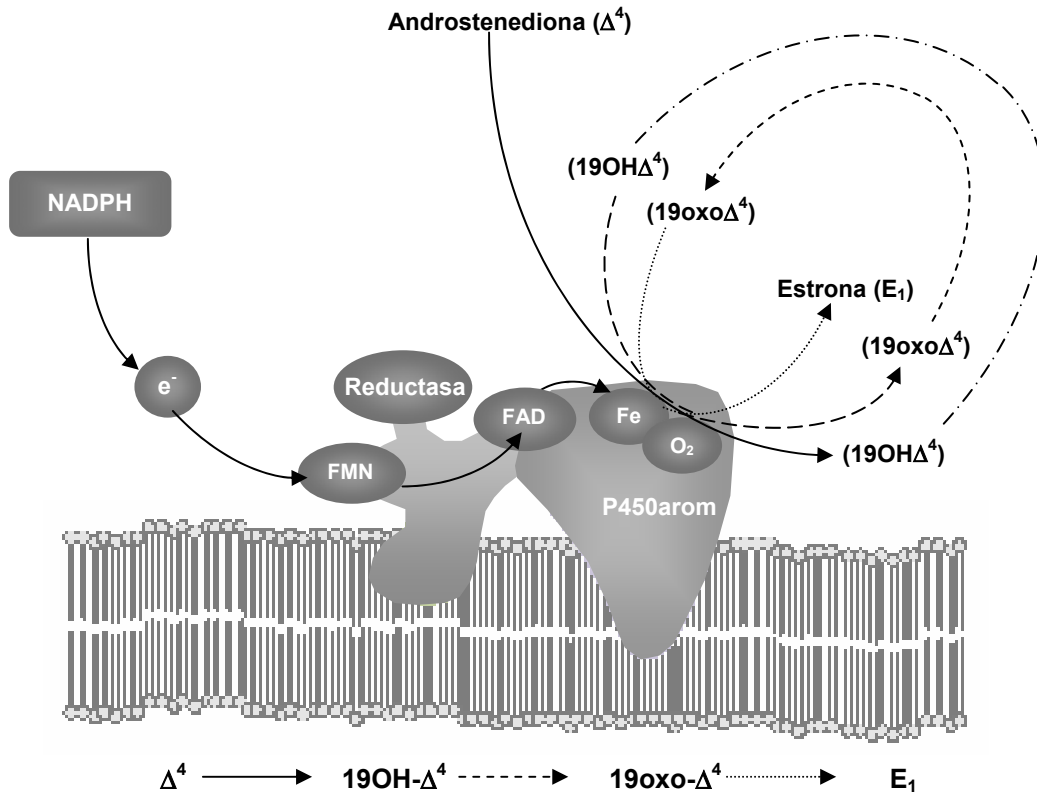


Fig. 3. Diagrama esquemático del anclaje del complejo citocromo P450 aromatasa y NADPH-citocromo P450 oxido-reductasa a la membrana del retículo endoplasmático liso. Se señalan los grupos prostéticos: Flavin adenina dinucleótido (FAD) de la aromatasa y Flavin mononucleótido (FMN) de la reductasa, los electrones (e^-) procedentes de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) reducida, así como el hierro (Fe) y el oxígeno molecular (O_2) en el sitio de unión de la P450 aromatasa. Los 19OH- y 19oxo-intermediarios se representan entre paréntesis.

El proceso de aromatización de los esteroides sexuales

Ambos componentes del complejo aromatasas, P450arom y reductasa, se encuentran anclados en la membrana del retículo endoplasmático liso (Fig. 3). La aromatización implica dos hidroxilaciones en el grupo metilo del carbono 19, formando como intermediarios 19-hidroxiandrostenediona y 19-oxoandrostenediona (Conley y Walters, 1999).

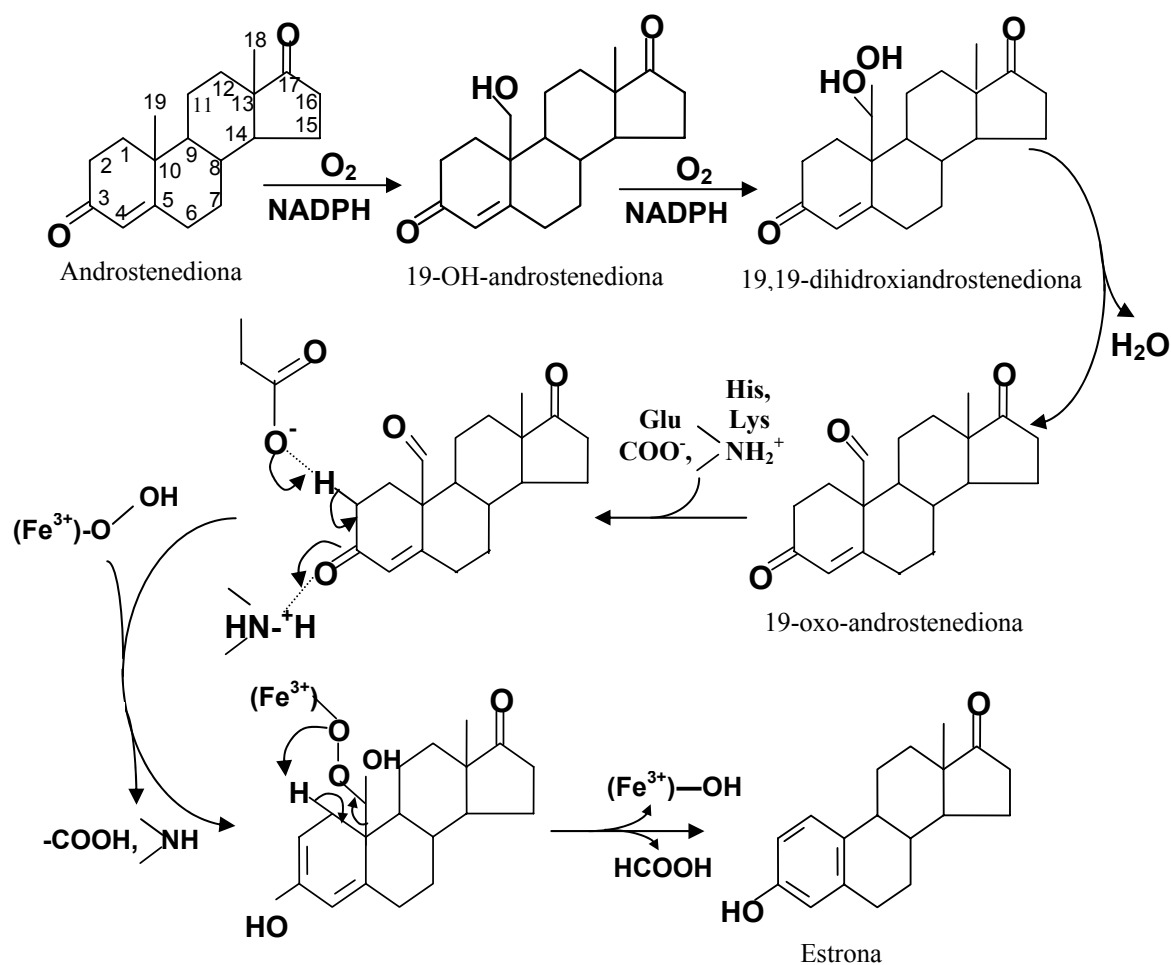
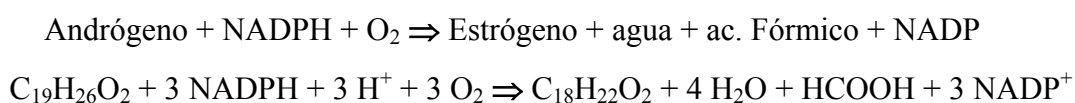


Fig. 4. Esquema de la aromatización. De las tres incorporaciones de oxígeno, sólo la tercera se muestra con detalle. Los compuestos en los que no se indica nombre son peroxienzimas intermedias. La androstenediona, con aporte de oxígeno y donadores de electrones (NADPH), se transforma en estrona, ácido fórmico y agua. Modificado de Simpson et al., 1994.

Sin embargo, aún se discute la necesidad de una tercera hidroxilación por parte de una actividad desmolasa para culminar la aromatización del anillo aromático (Conley y Walters, 1999). La reacción de aromatización, en detalle, consiste en la formación de un anillo aromático único en animales (Fig. 4) (Conley y Walters, 1999). Para la síntesis de un mol de estrógeno es necesaria la transferencia de tres pares de electrones, consumiendo tres moles de oxígeno y tres de NADPH según la siguiente ecuación estequiométrica:



Isoformas del gen de la aromatasa

Como excepción a la regla en mamíferos, en el cerdo existen diferentes transcritos producto de tres isoformas diferentes del gen de la aromatasa (tipo I - ovario, tipo II - placenta y tipo III – embrión) gracias a complejos mecanismos de *splicing* (Graddy et al., 2000) En los últimos años se ha demostrado la existencia de dos isoformas de la aromatasa en algunas especies de teleósteos, una en cerebro (P450aromB) y otra en ovario (P450aromA). Según Genbank hasta el momento se han clonado las dos isoformas en tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (Chang et al., 1997; Kwon et al., 2001), pez dorado, *Carassius auratus* (Tchoudakova y Callard, 1998), tilapia de Mozambique, *Oreochromis mossambicus* (Cruz y Canario, 2000), lubina, *Dicentrarchus labrax* (Dalla Valle et al., 2002; Blázquez y Piferrer, datos no publicados) y pez cebra, *Danio rerio* (Kishida y Callard, 2001), basándose en secuencias de DNA de genes expresados en esos órganos. Sin embargo, estas secuencias demuestran dos genes que codifican para dos isoformas diferentes del enzima aromatasa pero no proporcionan información sobre si poseen diferentes propiedades catalíticas. Para resolver esta incógnita, recientemente se han llevado a cabo estudios mediante transfección del gen en células COS en el pez

dorado (Zhao *et al.*, 2001). No obstante, frente a la ventaja que ofrecen este tipo de estudios, evitando el uso de cofactores o permitiendo conocer si dos actividades catalíticas provienen de dos enzimas diferentes, surgen las desventajas de tener que asegurarse que la expresión de la proteína en células transfectadas es a niveles comparables (Zhou *et al.* 1991) o si existen rutas constitutivas que puedan interferir, como el caso de la actividad 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa de las células COS (Trant, 1994). Para explicar el significado de estas dos isoformas, basándose en la existencia de una duplicación del genoma en un pez ancestral, se postuló que posiblemente se generó un mecanismo de preservación de la duplicación, mediante mutaciones de las secuencias reguladoras (Force *et al.*, 1999).

Distribución subcelular de la aromatasa

Dentro de la célula, el enzima aromatasa se localiza en el retículo endoplasmático liso, por lo que tras centrifugaciones para separar la fracción nuclear y mitocondrial, una ultracentrifugación a 100000 x g resulta en un precipitado que contiene la fracción microsómica formada por la membrana del retículo endoplasmático. Esta asociación del enzima a dicho retículo se ha conservado a lo largo de la evolución (Simpson *et al.*, 1994). Los resultados sobre actividad aromatasa en esta fracción muestran mayores valores que los encontrados en tejido homogenado crudo o en fragmentos, debido a la purificación parcial del enzima en la preparación microsómica y el consiguiente aumento de la actividad específica.

Distribución anatómica de la aromatasa

En mamíferos se ha demostrado que la aromatasa se expresa en diferentes órganos y tejidos, tales como testículo, ovario, cerebro, hígado, tejido adiposo, así como en la placenta y en numerosos tejidos fetales (Simpson *et al.*, 1994). En relación a la

distribución de la actividad aromatasa en el cuerpo de vertebrados no mamíferos, se observó que en la tortuga (*Chrysemys picta*) la actividad aromatasa fue máxima en cerebro, se detectó en gónadas pero fue negativa en músculo, hígado y tejido adiposo (Callard *et al.*, 1977). En algunas especies de aves se ha demostrado, por recristalización a actividad específica constante, que la actividad aromatasa estaba presente en cerebro e hígado pero no en testículo, músculo o glándula adrenal (Silverin *et al.*, 2000). En una escórpora (*Myoxocephalus octodecimspinosus*), los resultados fueron parecidos a los encontrados en tortuga y aves y, ninguno de los siguientes tejidos convirtieron el sustrato inyectado, ³H-19-hidroxiandrostenediona, en estrógeno: hígado, testículo, riñón, corazón, músculo, piel y agallas (Callard *et al.*, 1981). El estrógeno sintetizado extragonadalmente actúa predominantemente a nivel local de manera paracrina o autocrina (Labrie *et al.*, 1998).

Los estudios de determinación de actividad aromatasa se basan en analizar su distribución anatómica, así como la distribución en el cerebro, el patrón a lo largo del desarrollo y de un ciclo anual completo. Actualmente, se complementan estos aspectos mencionados con técnicas inmunocitoquímicas y moleculares, incluyendo la hibridación *in situ*. Estos estudios más recientes esclarecen cuestiones de localización, expresión y contenido de la aromatasa. Como ejemplos, se puede mencionar la no detección del enzima aromatasa por inmunolocalización en testículo de la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Kobayashi *et al.*, 1998), la expresión del gen de la aromatasa ovárica en lubina, tanto en ovario como en cerebro y testículo a niveles más bajos (Dalla Valle *et al.*, 2002), detección del gen de la aromatasa por hibridación *in situ* en diferentes partes del cerebro que afectan la función reproductora y el comportamiento sexual en ambos sexos del pez cebra (Tong *et al.*, 2001).

Distribución neuroanatómica de la aromatasasa

En relación con la distribución de la actividad aromatasasa en el cerebro, existen estudios tanto bioquímicos como microanatómicos que demuestran que los mayores niveles se localizan en las regiones implicadas en el control de la reproducción en todas las especies de teleósteos analizadas: el escorpénido citado anteriormente (Callard *et al.*, 1981); el pez dorado, (Pasmanik y Callard, 1985); el pez espinoso, *Gasterosteus aculeatus* (Borg *et al.*, 1987); el pez gato africano, *Clarias gariepinus* (Timmers *et al.*, 1987); el salmón del Atlántico, *Salmo salar* (Andersson *et al.*, 1988; Mayer *et al.*, 1991); y la tilapia de Mozambique, (Callard *et al.*, 1988).

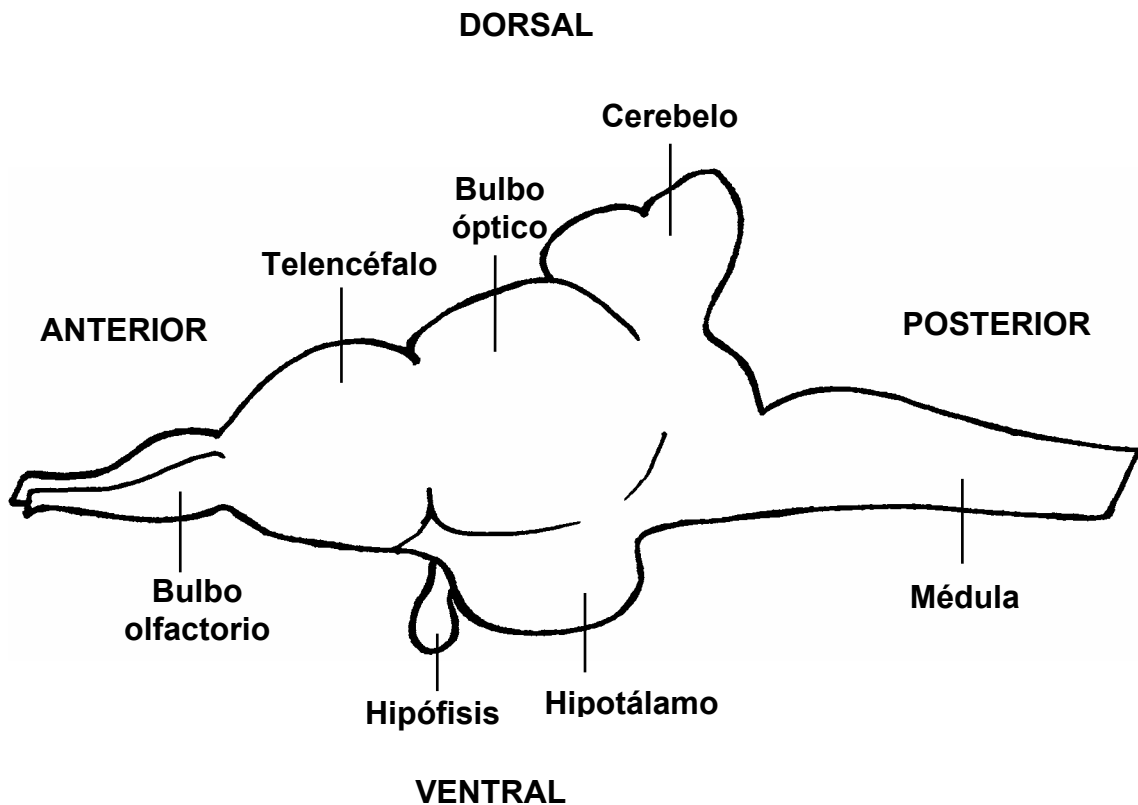


Fig. 5. Esquema del cerebro de la lubina como representativo del cerebro de un teleósteo típico. Se indican las principales áreas del cerebro. Modificado de Cerdá-Reverter *et al.*, 2001a.

Esta región denominada comúnmente “cerebro reproductivo” está formada por la parte anterior, comprendiendo fundamentalmente y según la fig. 5: el bulbo olfatorio, el telencéfalo y el hipotálamo. También está demostrado el alto nivel de actividad aromatasa en la hipófisis de los teleósteos (Callard et al., 1981).

Funciones de los neuroestrógenos

La localización de la actividad aromatasa en órganos tales como el cerebro o la hipófisis hace pensar que los neuroestrógenos allí sintetizados deben tener una función diferente a la atribuida al estrógeno secretado por las gónadas que fluye por el torrente sanguíneo (Callard et al., 1995). En aves existen evidencias sobre la implicación de los neuroestrógenos en el control del comportamiento sexual (Balthazart, 1997), así como la localización de altos niveles de aromatasa en las zonas del cerebro que controlan el aprendizaje del canto (Doupe, 1994). La actividad aromatasa por unidad de proteína es excepcionalmente alta en el cerebro de los teleósteos, alrededor de 100 a 1000 veces la actividad encontrada en mamíferos (Callard *et al.*, 1993). Aunque la función de los altos niveles de esta gran actividad aromatasa constitutiva en el cerebro de todos los teleósteos analizados está aún por resolver, una de las hipótesis más razonables apunta a que el potencial para una alta síntesis de neuroestrógenos está relacionada con la notable neuroplasticidad y poder regenerativo del que disfruta el sistema nervioso central de peces adultos (Callard et al., 2001; Menuet et al., 2002). Por ello, se le atribuye al estrógeno un papel de factor regulador de los procesos de desarrollo neural y plasticidad a lo largo de toda la vida. A pesar de que los primeros estudios sobre la función de los neuroestrógenos se llevaron a cabo en mamíferos, intentando relacionar los mencionados esteroides con el control de la reproducción, actualmente existen evidencias en roedores y también en aves de que afectan la proliferación, supervivencia y morfología neural, así como otras funciones en diferentes regiones del cerebro (McEwen, 1999). De hecho, existen tratamientos de sustitución de estrógenos para evitar o retrasar enfermedades

degenerativas tales como Alzheimer o Parkinson en mujeres postmenopáusicas, así como para mejorar las capacidades cognitivas de pacientes de ambos sexos en estado no senil (Williams, 1998; Shaywitz et al., 1999).

Presencia de la actividad aromatasa en vertebrados

Todas las clases de vertebrados analizadas hasta la fecha muestran biosíntesis de estrógenos, incluyendo mamíferos, aves, reptiles, anfibios, teleósteos (osteictios), elasmobranquios y agnatos (Callard *et al.*, 1978; Callard, 1980), así como en el protocordado *Amphioxus* (Callard et al., 1984). Recientemente, parece haberse detectado síntesis de estrógeno en pulpos, aunque no se conoce bien la función de estos estrógenos en invertebrados (Di Cosmo et al., 2001). La familia de genes del citocromo P450 aromatasa y similares parece derivar de un antiguo linaje de los productos del gen P450 que divergió hace unos 1000 millones de años (Nelson *et al.*, 1993).

Regulación de la actividad aromatasa

Existen varios estudios sobre la regulación de la aromatasa, especialmente su expresión. En el cerebro de mamíferos adultos, el andrógeno regula positivamente tanto la actividad aromatasa como su mRNA (Roselli y Resko, 2001). Sin embargo, tratamientos con estrógeno de ratas recién nacidas aumenta el potencial de aromatización (Roselli and Klosterman, 1998). Del mismo modo, se ha demostrado *in vivo* (Hickey et al., 1990) e *in vitro* (Fitzpatrick y Richards, 1991) que tratamientos con la hormona folículo-estimulante (FSH) en células de granulosa aumenta la actividad aromatasa en ratas. En adultos de pez dorado y embriones de pez cebra existen evidencias de regulación positiva por medio de estrógeno de la expresión del mRNA de la isoforma P450aromB de cerebro (pero no de la P450aromA del ovario), observándose un aumento de la intensidad de la banda correspondiente al gen de la aromatasa tras una RT-PCR, así como mediante un Southern

blot (Kishida y Callard, 2001). También fue posible aumentar la expresión de la aromatasa tras inyectar cápsulas silásticas de un andrógeno aromatizable (testosterona) a peces dorados a los que se les extrajeron las gónadas, mientras que la inyección de andrógenos no aromatizables (dihidrotestosterona) disminuyó la expresión (Gelinas et al., 1998). En conjunto, estos resultados sugieren que el estrógeno puede formar parte de una retroalimentación positiva autorreguladora responsable de los incrementos de la expresión de la aromatasa neural. También se sugiere que el estrógeno puede controlar directamente la expresión de la aromatasa de cerebro a través de elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el promotor del CYP19b (Tchoudakova et al., 2001). En otras especies de teleósteos además del pez dorado (Kagawa et al., 1984), como la medaka (Nagahama et al., 1995), se ha demostrado la regulación positiva de la hormona gonadotrofina (GtH) sobre la actividad aromatasa de folículos ováricos. Se ha comprobado también la estimulación de la actividad aromatasa por parte de la hormona del crecimiento en la trucha moteada, *Cynoscion nebulosus* (Singh y Thomas, 1993). Por el contrario, estos efectos no se observaron en el salmón japonés, *Oncorhynchus rhodurus*, (Young et al., 1983) o la trucha arco iris (de Mones y Fostier, 1989). Sin embargo, la hormona luteinizante (LH) ejercería una regulación negativa en los niveles de mRNA de la P450arom (Hickey et al., 1990; Fitzpatrick et al., 1997). En la tilapia de Mozambique, la administración tanto de estradiol como de paraclorofenilalanina (inhibidor de la síntesis de 5-hidroxitestosterona) durante los días 7 y 10 después de la eclosión del huevo provocó una disminución en la actividad aromatasa de cerebro; por el contrario, la metiltestosterona aumentó la actividad aromatasa de cerebro. Curiosamente, el periodo de máximo efecto de este andrógeno aromatizable sobre la proporción de sexos coincidió con la habilidad del mismo para inducir el aumento de la actividad aromatasa de cerebro (Tsai et al 2000).

Métodos de determinación de la actividad aromatasa

Como se ha visto anteriormente, la conversión de andrógenos a estrógenos mediada por aromatasa es una reacción equimolar (1 mol de sustrato da 1 mol de producto). Por tanto, la actividad aromatasa se podría medir, en principio, tanto por la desaparición del sustrato como por la aparición del producto. En la práctica, y debido a que el sustrato debe estar a una concentración no limitante para poder medir la actividad máxima, se mide la formación de producto por unidad de proteína en un determinado periodo de tiempo. Por consiguiente, dependiendo del andrógeno que se emplee como sustrato, se pueden diferenciar los siguientes métodos de medida de la actividad aromatasa (Tabla. 1):

Tabla 1. Esquema de los diferentes tipos de medición de actividad aromatasa

Método	Sustrato	Producto de interés	Separación del producto	Cuantificación del producto
Directo	$7\text{-}^3\text{H-}\Delta^4$ / $1,2,6,7\text{-}^3\text{HT}$	$7\text{-}^3\text{HE}_1$ / $1,2,6,7\text{-}^3\text{HE}_2$	Extracción con solvente orgánico + cromatografía	Contaje con líquido de centelleo
Indirecto	$1\beta\text{-}^3\text{H}\Delta^4$	$^3\text{H}_2\text{O}$	Fraccionamiento de fase acuosa y orgánica	Contaje con líquido de centelleo
Directo	T/Δ^4	E_2/E_1	Extracción con solvente orgánico	RIA

Abreviaturas: ^3H = tritio, Δ^4 = Androstenediona, T = testosterona, E_1 = estrona, E_2 = estradiol, RIA = radioinmunoensayo.

a) Método directo: Se utiliza como sustrato la androstenediona o testosterona marcada con tritio en el carbono 7 ($7\text{-}^3\text{H}$ -androstenediona/ $7\text{-}^3\text{H}$ -testosterona). Tras la aromatización del sustrato el carbono 7 forma parte de la estrona o estradiol, respectivamente (Fig. 4). En este caso, la técnica empleada para separar el estrógeno

formado es por cromatografía de capa fina (TLC) o cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Tras la incubación, se realiza una extracción del estrógeno con cloroformo para que una vez transferido a la fracción orgánica no polar se pueda evaporar el solvente y resuspender el estrógeno adherido al tubo en un volumen suficientemente pequeño como para aplicar en una placa de sílica-gel para proceder a la cromatografía, cuando la técnica empleada es la TLC. También como método directo existe la posibilidad de usar el sustrato no radiactivo y medir la producción de estrógeno en el medio mediante un radioinmunoensayo (RIA). En este caso, es radiactivo el estrógeno que se añade para que compita por el anticuerpo con el estrógeno secretado al medio por el tejido. Finalmente, se eliminan los metabolitos libres lavando con DCC y se cuantifica el anticuerpo unido al antígeno radiactivo.

- b) Método indirecto: Es un ensayo radiométrico conocido como el método del agua tritiada. Fue descrito por primera vez por Osawa y Spaeth, (1971) para medir la actividad aromatasas por la pérdida del $1\beta\text{-}^3\text{H}$, contenido en el sustrato, en la fase acuosa durante la reacción de la aromatización (Lephart and Simpson, '91). Como sustrato se emplea androstenediona tritiada en el carbono 1 en la posición β ($1\beta\text{-}^3\text{H}$ -androstenediona). Tras la aromatización, el tritio del carbono 1 forma parte de la molécula de agua generada junto con la estrona y el ácido fórmico tal y como se señalaba al inicio de la introducción. Para cuantificar la cantidad de producto formado, en este caso la cantidad de agua tritiada que será equimolar al estrógeno formado, se emplea el mencionado ensayo. La incubación es similar a la del método directo de estrógeno, pero la separación con cloroformo se usa para eliminar precisamente tanto el sustrato sin convertir como el metabolito principal. En este caso la fase orgánica (conteniendo el sustrato sin convertir) se descarta mientras que la fracción acuosa (que contiene el agua tritiada) se lava con carbón activo (DCC) para finalmente obtener un sobrenadante limpio de compuestos orgánicos y medir la radiactividad contenida en el agua tritiada. La ventaja de este método empleado en algunas especies de peces

(Pasmanik y Callard, 1985; Antonopoulou *et al.*, 1995) es su relativa simplicidad para llevarlo a cabo, pero puede dar falsos positivos cuando se emplea para detectar niveles muy bajos de actividad aromatasas o no se valida meticulosamente (Prefontaine *et al.*, 1990).

Además del tipo de sustrato, también es importante elegir adecuadamente la forma en la que se encuentra el tejido por las razones que se detallan a continuación. Las tres posibilidades que se mencionan se refieren siempre a experimentación *in vitro*:

Fragmentos: Frente a la ventaja de la facilidad y simplicidad para la obtención de fragmentos, aparece la desventaja de elegir un fragmento no representativo del tejido entero, debido a las diferencias de actividad dentro de un mismo tejido, como ocurre con las diferentes áreas del cerebro. Igualmente, al trabajar con fragmentos grandes, cabe la posibilidad de que el sustrato no penetre bien dentro del tejido. Se usan fragmentos en incubaciones de tejidos u órganos ricos en actividad aromatasas, por ejemplo, la hipófisis, que por su tamaño dan la seguridad de que el sustrato llega con facilidad al enzima (Olivereau y Callard., 1985).

Homogenados: Presenta la ventaja de trabajar con una mezcla homogénea del tejido y, en el caso de emplear distintos tratamientos, permite replicados perfectos. En algunas ocasiones se realizan mezclas de varios fragmentos de un mismo órgano o de diferentes organismos. La desventaja en este caso puede ser la dilución de altas actividades contenidas en un fragmento con las bajas de los demás fragmentos homogenados. Sin embargo, es el tipo de preparación más utilizado por su fácil preparación, aunque precise de la adición de cofactores (Callard et al., 1981).

Microsomas: El proceso de obtención es más tedioso, puesto que requiere sucesivas centrifugaciones para descartar las fracciones no deseadas (nuclear y mitocondrial). Sin

embargo, la purificación del enzima es mayor. Como se explicaba con anterioridad, la aromatasas se localiza concentrada en el retículo endoplasmático liso, cuyas membranas forman la fracción microsómica tras las mencionadas centrifugaciones, obteniendo pues una medida más real de la actividad aromatasas en dicha fracción que en homogenados o fragmentos. Es ventajoso en tejidos donde se sabe que los niveles constitutivos de actividad aromatasas no son altos, o cuando no lo son debido al estadio del animal.

Recientemente, se han llevado cabo estudios para determinar las propiedades catalíticas del enzima utilizando este tipo de preparación (Zhao et al., 2001). Al trabajar con homogenados, permite también muy buenos replicados.

El método del agua tritiada ha sido el ensayo más común para determinar la actividad aromatasas, excepto en los tejidos donde se detectaba y no se esperaba una alta actividad, en cuyo caso se confirmaba la presencia de aromatasas con el método directo de medida de estrógeno con recristalización a actividad específica constante. Esto se empleó en las primeras detecciones de aromatasas en el cerebro de peces que, sorprendentemente, mostraban de 100 a 1000 veces mayor actividad por unidad de proteína que la medida en los tejidos de mamíferos, donde se había estudiado anteriormente (Callard *et al.*, 1993).

Inhibición enzimática

La actividad aromatasas puede regularse tanto incidiendo sobre los niveles de expresión del gen así como directamente sobre la actividad del enzima ya formado. Por sus implicaciones en algunos tumores estrógeno-dependientes, el enzima aromatasas ha sido objeto de numerosos estudios encaminados a su inhibición reversible e irreversible (Brueggemeier, 2002). En este último caso se han desarrollado inhibidores que interfieren en la formación del complejo enzima-sustrato tras su unión covalente altamente estable. Estos inhibidores irreversibles se conocen en la literatura en inglés como “suicidal

aromatase inhibitors” y un ejemplo de ellos sería el exemestano (Higa, 2002). Sin embargo, desde el punto de vista farmacológico, lo importante es la inhibición reversible. A continuación se mencionan los diferentes tipos de inhibición enzimática reversibles existentes (Fig. 6), o al menos los más característicos de los tratados en esta investigación:

Inhibidores reversibles: Sustancias que forman complejos dinámicos con el enzima confiriéndole diferentes propiedades cinéticas que cuando se encuentra el enzima solo. Dentro de este tipo se encuentran:

1. Inhibición parcial: El complejo enzima-inhibidor tiene actividad catalítica residual porque la inhibición no es completa. Es más común describirlo como inhibición hiperbólica, en referencia a la línea que aparece al representar K_m/V vs $[I]$. Existe un extracto lipidoesteroico de *Pygeum africanum* que inhibe parcialmente la aromatasa de los tumores de próstata (Ishani et al., 2000).

2. Inhibición total o lineal: El enzima al saturarse con el inhibidor no tiene actividad catalítica. También es llamada inhibición lineal por el tipo de líneas que aparecen al representar K_m/V vs $[I]$. Dentro de este tipo se pueden encontrar las siguientes posibilidades:
 - 2.1 Inhibición competitiva o específica: Los inhibidores compiten con el sustrato por unirse al sitio de unión del enzima. La naturaleza del inhibidor puede ser parecida a la del sustrato, este es el caso del 4OH-Androstenediona, pero esta condición no es necesaria, tal y como ocurre con CGS 16949A.

2.2 Inhibición no competitiva: Los inhibidores parecen reaccionar con una parte del enzima diferente al centro de unión. Los inhibidores pueden ser químicamente diferentes del sustrato. Un ejemplo sería el anastrozole.

2.3 Inhibición acompetitiva o catalítica: Es raro que se de en reacciones con un solo sustrato. El inhibidor sólo se puede unir al complejo enzima-sustrato, no al enzima libre.

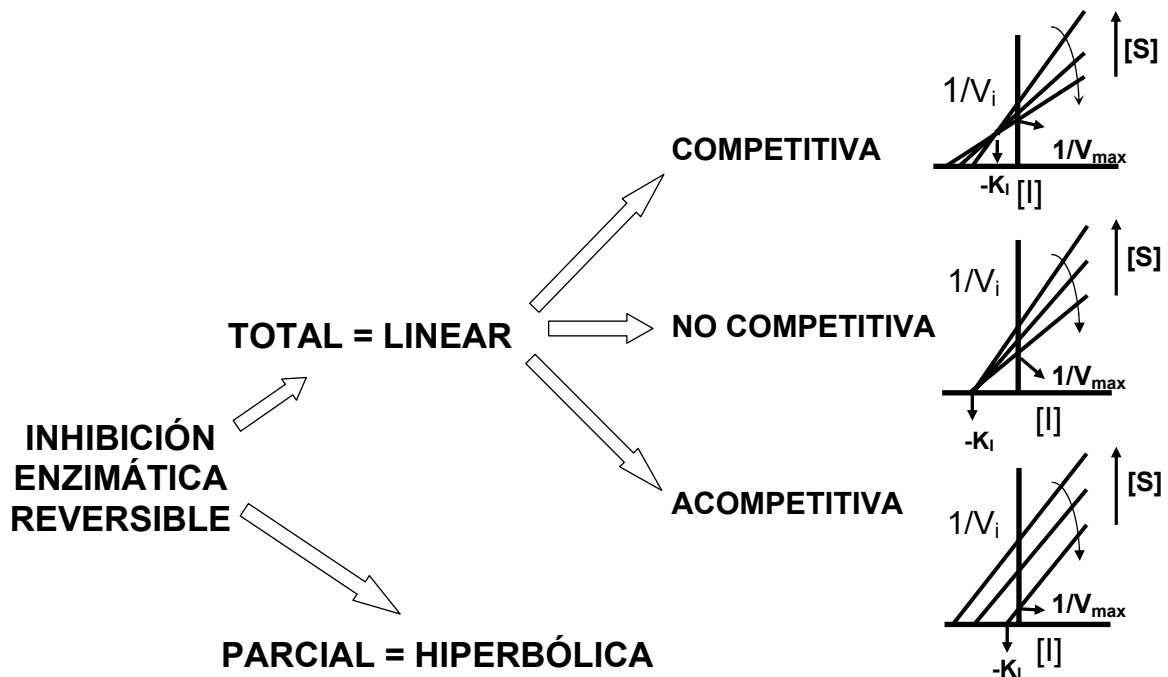


Fig. 6. Tipos de inhibición enzimática reversible. Ejemplo de representación semi-inversa de Dixon para cada uno de los tipos de inhibición total. Dependiendo del patrón de las líneas de regresión se determinará uno de los tres tipos de inhibición. V_{max} = Velocidad máxima de reacción, S = sustrato, I = inhibidor, V_i = Velocidad de inhibición, K_i = Constante de inhibición.

Las representaciones gráficas sirven para diagnosticar el tipo de inhibición y para determinar la potencia del inhibidor. En atención al valor diagnóstico y al carácter más o menos inmediato para obtener el valor de K_i , se establecen diferentes representaciones,

tales como Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf, Hofster, Scatchard, Dixon, Hunter-Down y Cornish-Bowden (De Arriaga et al., 1998). En esta investigación se usó la representación de Dixon para los estudios de inhibición y Lineweaver-Burk para linearizar las curvas dosis-dependiente de sustrato.

Esteroides sexuales y aromatasa en el ciclo reproductor de los peces

Eje cerebro-hipófisis-gónada

Los mecanismos que controlan la reproducción en teleósteos dependen del conjunto de la percepción de estímulos ambientales y la transmisión de señales neuroendocrinas a través del eje cerebro-hipófisis-gónadas. El objetivo final es el desarrollo de las gónadas y la formación de los gametos para llevar a cabo la reproducción, proceso esencial para la perpetuación de la especie. En la Fig. 7 se pueden observar los neurotransmisores, la dopamina (DA), así como las neuronas productoras de la hormona liberadora de las gonadotrofinas (GnRH) en el cerebro. En la hipófisis se encuentran las células productoras de gonadotrofinas (Melamed et al., 1998) y en las gónadas tiene lugar la síntesis de esteroides sexuales (Borg, 1994).

El funcionamiento de este eje está sometido a la influencia de factores externos que pueden modificar su estado y cambiar el curso de los procesos que controla. Esta plasticidad del eje es precisamente una característica muy evidente en animales poiquilotermos como, por ejemplo, los peces. Es precisamente la influencia de factores ambientales como el fotoperiodo o la temperatura externa la que determina en buena medida la estacionalidad de las puestas (Conover y Fleisher, 1986; Conover y Heins, 1987a,b). Los neurotransmisores presentes en diferentes tipos neuronales del cerebro regulan la secreción de GnRH o DA por parte de las neuronas encargadas de dicha función. A su vez la GnRH tiene una importante función estimuladora de la secreción de

GtHs mientras que la DA tiene una función eminentemente inhibidora. Las GtHs estimulan la secreción de esteroides sexuales en las gónadas. Existen dos tipos: GtH I (FSH en mamíferos) y GtH II (LH en mamíferos). En la trucha arco iris, la primera se detecta tan pronto como dos semanas después de la eclosión del huevo y durante la vitelogénesis y la segunda al final de la maduración del oocito y durante la ovulación (Gómez et., 1999). Los esteroides sexuales, ejercen a su vez un mecanismo de regulación por retroalimentación sobre el eje hipotálamo-hipofisiario, que puede ser positivo o negativo en función del estado reproductivo del animal (Fostier et al., 1983; Borg, 1994).

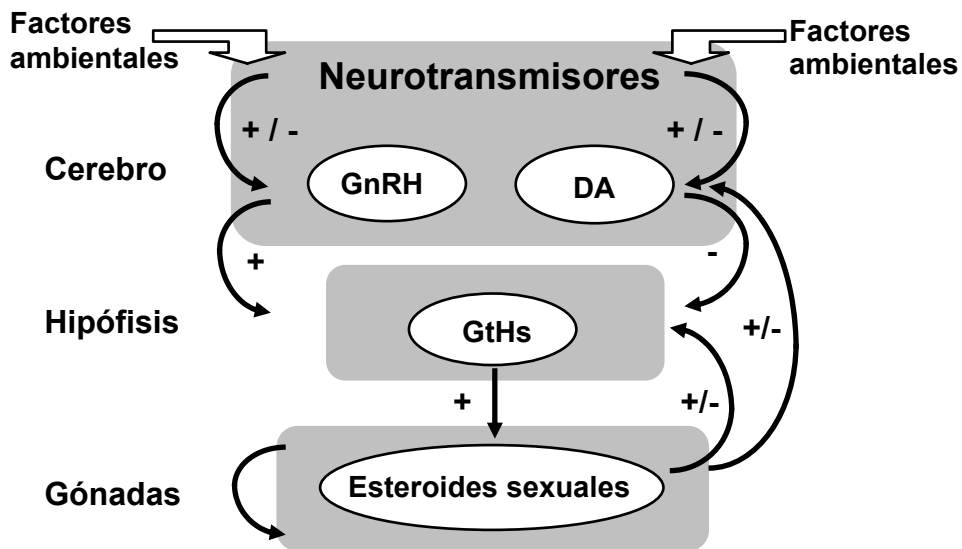


Fig. 7. Esquema del eje cerebro-hipófisis-gónada. Se señalan como hormona secretada por el cerebro la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH); como secretada por la hipófisis, la gonadotrofina (GtHs) y como neurotransmisor la dopamina (DA), así como los esteroides sexuales secretados por las gónadas. + = Estimulación; - = Inhibición.

Determinación sexual

Para que se produzca la expresión del sexo se requiere que ocurran tanto la determinación sexual como la diferenciación sexual. Así como la diferenciación sexual se

refiere a los eventos que ocurren durante el desarrollo y permiten la expresión del sexo genético en el apropiado sexo fenotípico, la determinación sexual, de forma simplificada, se define como la suma de elementos genéticos que son responsables de la existencia de las gónadas y depende de la combinación de los cromosomas de los progenitores. Los genes determinantes del sexo no serán sólo responsables de la presencia de las gónadas sino también de su forma (órganos fusionados o un par de órganos), de sí se diferenciarán en testículos u ovarios, si los ovarios tendrán o no cavidad ovárica (no todos los ovarios la tienen), etc. (Piferrer, 2001). En teleósteos gonocoristas existen varios tipos de sistemas de determinación sexual (Hunter y Donaldson, 1983):

1.- Cromosomas sexuales: La herencia cromosómica depende de la presencia de un par de cromosomas sexuales, llamados heterocromosomas, que han acumulado la mayoría de genes responsables para el desarrollo sexual (Bull, 1983; Tave, 1993). Al examinar el cariotipo de diversas especies no se pueden distinguir morfológicamente como ocurre en mamíferos. Normalmente, los peces no presentan heterocromosomas (Vorontsov, 1973; Yamazaki, 1983; Price, 1984; Tave, 1993; Solari, 1994) pero se han propuesto ocho sistemas cromosómicos basados en análisis citogenéticos. Los sistemas sencillos, como XX/XY o WZ/ZZ, son los más comunes en peces, además existen sistemas más complejos que involucran más de un par de cromosomas sexuales o diferente número de cromosomas dependientes del sexo (Tave, 1993). La mayoría de especies de teleósteos de interés comercial no muestran una proporción de sexos machos:hembras diferente de 1:1 independientemente de los progenitores usados o de las condiciones ambientales, lo que sugiere que poseen un sistema cromosómico de determinación sexual de hembra/macho, XX/XY o ZW/ZZ.

2.- Mecanismo poligénico o polifactorial: Los autosomas junto con los cromosomas sexuales son los responsables de la determinación sexual, debido a que los genes sexuales están repartidos por todo el genoma. Este sistema se caracteriza por una

variabilidad muy alta en la proporción de sexos entre familias (Gold, 1979; Bull, 1983; Price, 1984; Francis, 1992; Tave, 1993).

3.- Mecanismo de determinación sexual ambiental (ESD): Implica interacciones genotipo-ambiente. Hay un claro caso en peces, el *Menidia menidia*, donde la determinación sexual está bajo el control genético y ambiental, dependiendo de la temperatura de incubación durante el crítico periodo de desarrollo larvario (Conover y Fleisher, 1986; Conover y Heins, 1987a,b), como se ha observado en varias especies de reptiles (Bull, 1983). En los últimos años, varios estudios han mostrado que el sexo en peces puede estar bajo la influencia de la temperatura ambiente a la que se desarrollan. Este hecho se está confirmando en varias especies (Baroiller et al., 1999), abriendo pues la posibilidad de un control efectivo del sexo por manipulación ambiental. Algunos autores sostienen que en cualquier caso los factores ambientales afectan al proceso de diferenciación sexual, e.g., modulando la actividad aromatasa, y no al de determinación sexual por lo que sería más apropiado hablar de diferenciación sexual ambiental (Hayes, 1998; Piferrer, 2001). De hecho, la temperatura ambiental determina el sexo afectando al proceso de diferenciación sexual, no al de determinación sexual (Piferrer, 2001).

Esteroides sexuales y diferenciación sexual

Descartado el modelo corticomedular y el mecanismo del antígeno H-Y (Hunter y Donaldson, 1983), se le otorga a los esteroides sexuales el papel responsable de la diferenciación sexual. Tratamientos hormonales y manipulaciones ambientales permiten invertir el sexo en peces sugiriendo un papel importante de estos dos factores en la diferenciación sexual gonadal (Yamamoto, 1969; Bull, 1983; Yamazaki, 1983; Hunter y Donaldson, 1983; Baroiller et al., 1999; Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002). Los esteroides sexuales son los factores endógenos responsables de la diferenciación sexual en

peces, los andrógenos de la masculinización y los estrógenos de la feminización (Yamamoto, 1969; Yamazaki, 1983; Nakamura et al., 1998; Baroiller et al., 1999; Piferrer, 2001; Devlin y Nagahama, 2002). Se han usado varias aproximaciones para demostrar la implicación de los esteroides sexuales en la diferenciación sexual, tales como la inversión de sexo, inhibición de enzimas esteroideogénicas o antagonistas de receptores de esteroides, la medida de esteroides plasmáticos y caracterización histológica de células productoras de esteroides (Baroiller et al., 1999).

Los esteroides sexuales regulan el eje cerebro-hipófisis-gónadas y consecuentemente la diferenciación sexual (Baroiller et al., 1999). Como en otros vertebrados, la actividad aromataza en peces está implicada en la retroalimentación de los esteroides sexuales y en la regulación en procesos clave en el ciclo ovárico, de ahí que la actividad aromataza este concentrada en el cerebro “reproductivo” y en la hipófisis (Callard *et al.*, 1981; Timmers *et al.*, 1987).

Las gónadas se consideraban el primer sitio de aromatización, sin embargo, en la última década se ha postulado la posibilidad de que sea el cerebro el determinante de la diferenciación de la gónada y no al revés. En esta hipótesis se proponía que el gen determinante del sexo en teleósteos iniciaría los procesos en el cerebro y tras éstos se produciría la diferenciación sexual en las gónadas (Francis, 1992). Los únicos requisitos para que se cumpliera este supuesto eran que el sistema nervioso central, especialmente el eje hipotálamo-hipófisis, estuviese activo en la época de diferenciación sexual y que los esteroides pudiesen tener un efecto de retroalimentación en dicho eje. Esta última condición de la implicación de los esteroides en el eje cerebro-hipófisis-gónada ya ha sido demostrada (Kah *et al.*, 1993), además es posible cambiar el sexo de los peces a través de tratamientos con GnRH o GTH I y GTH II (Tao *et al.*, 1993 y Ravaglia *et al.*, 1997). En peces hermafroditas se ha podido inducir el cambio de sexo con hCG (Koulish y Kramer, 1989) y neuropeptido Y (Kramer e Imbriano, 1997). Es decir, todas estas hormonas o

neurotransmisores están implicadas en el control del funcionamiento del eje cerebro-hipófisis-gónada, apoyando así la teoría del cerebro como primer sitio de aromatización, al menos en peces hermafroditas, pues en peces gonocoristas aún no existen suficientes evidencias.

El sistema nervioso central en vertebrados se desarrolla completamente cuando ha transcurrido el 10-15% de la vida del embrión (Laming, 1981). En la tilapia del Nilo, debido que la expresión del gen de la aromatasa, tanto en cerebro como en gónada, ocurre alrededor de los 3-4 días después de la fertilización (dpf), mientras que los primeros inicios de diferenciación sexual en gónadas ocurren unos 20 días después (27-30 dpf) (Kwon et al., 2001), lo que apoyaría la teoría del cerebro como primer sitio de aromatización. Así, la diferenciación sexual de los machos en la tilapia de Nilo tendría lugar por una represión del gen de la aromatasa y la diferenciación de las hembras no ocurriría por una sobreexpresión de dicho gen (Kwon et al., 2001).

Función de los andrógenos 11 β -hidroxilados

En teleósteos se ha sugerido que los andrógenos 11 β -hidroxilados en lugar de la T, como se pensaba tradicionalmente, están implicados en los procesos clave del desarrollo (Baroiller *et al.*, 1999) (Fig. 2), incluyendo la diferenciación gonadal, en donde la actividad aromatasa juega un papel importante. De hecho, se ha demostrado que tratamientos con andrógenos 11 β -hidroxilados masculinizan gónadas sexualmente indiferenciadas en la trucha arco iris (Van den Hurk *et al.*, 1989; Feist *et al.*, 1995), la tilapia del Nilo (Baroiller and Toguyeni, 1996) y la carpa común, *Cyprinus carpio* (Komen *et al.*, 1995). En el pez gato africano, los 11 β -hidroxiandrógenos provocan un aumento del tamaño de las neuronas secretoras de GnRH y disminuyen la secreción de LH por parte de la hipófisis (Rebers *et al.*, 2000). Inhibieron también la expresión del gen de la aromatasa ovárica en la trucha arco iris (Govoroun *et al.*, 2001). Por ello, es posible

que la producción local de andrógenos 11β -hidroxilados pueda afectar la acción de la aromatasa.

Función de la aromatasa en la diferenciación sexual

El balance entre andrógenos y estrógenos es esencial no sólo para el normal desarrollo sexual y función reproductiva sino también para el normal crecimiento y fisiología de ambos sexos. En el ámbito tisular local, tanto la expresión como la actividad aromatasa mantienen este crítico balance de la producción de andrógenos y estrógenos (Conley y Walters, 1999). Se creía que en algunas especies, particularmente en los “vertebrados inferiores”, influye decisivamente en el proceso de diferenciación sexual (Bogart, 1987). Sobre el posible rol de la actividad aromatasa, actualmente existen numerosos estudios que muestran que la aromatasa por el hecho de encontrarse al final de la ruta esteroidogénica actúa como enzima clave en la producción de andrógenos vs estrógenos y por consiguiente en el proceso de diferenciación sexual (Jeyasuria and Place, 1998). Asimismo, hembras genóticas sexualmente indiferenciadas de salmón real, *Oncorhynchus tshawytscha*, tratadas con un inhibidor específico se desarrollaron como machos fenotípicos, lo que demuestra la importancia de la aromatasa en la diferenciación ovárica (Piferrer *et al.*, 1994). Resultados similares se han obtenido en la trucha arco iris (Guiguen *et al.*, 1999), el lenguado japonés, *Paralichthys olivaceus* (Kitano *et al.*, 2000) y la tilapia del Nilo (Baroiller *et al.*, 1995; Kwon *et al.*, 2000). Recientemente, se ha demostrado que en la tilapia del Nilo, una especie con determinación sexual tanto genética como debida al ambiente, la aromatasa juega un papel decisivo en la diferenciación ovárica mientras su represión parece ser necesaria para la diferenciación testicular (Kwon *et al.*, 2001; D’Cotta *et al.*, 2001). En conjunto, estos estudios apoyan la implicación de la actividad aromatasa en la diferenciación sexual de los vertebrados inferiores.

Según lo descrito, la aromatasa juega un papel importante manteniendo o acelerando la diferenciación sexual en gónada pero no como factor de iniciación del proceso. En este último caso, cabría esperar que la expresión del gen de la aromatasa en la posible área correspondiente a la gónada tuviese lugar antes de la señal de diferenciación sexual, sin embargo, existen varios trabajos que evidencian lo contrario (trucha arco iris, Guiguen *et al.*, 1999; lenguado japonés, Kitano *et al.*, 1999). Asimismo, la expresión de aromatasa en ovario, tras la diferenciación sexual, incrementaba más que en testículo.

Efectos ambientales sobre la actividad aromatasa

Los efectos de los factores ambientales sobre la proporción de sexos ha sido objeto de estudio en reptiles, demostrando un efecto de la temperatura sobre la diferenciación sexual (Desvages y Pieau, 1992; Crews *et al.*, 1994; Richard-Mercier *et al.*, 1995; Jeyasuria y Place, 1997; Pieau *et al.*, 1999). Igualmente se han detectado diferencias en la expresión del gen de la aromatasa en reptiles cuyo periodo crítico de diferenciación sexual se llevó a cabo a diferentes temperaturas (Gabriel *et al.*, 2001). Asimismo, en teleósteos gonocoristas existen evidencias de los efectos de la temperatura sobre la proporción de sexos (Baroiller *et al.*, 1999).

En cuanto a la diferenciación sexual la temperatura-dependientes existen diferentes modelos:

- Incremento en el número de machos cuando las fases críticas del desarrollo se llevan a cabo a altas temperaturas (*Hoplosternum littorale*, Hostache *et al.*, 1995; *Poeciliopsis lucida*, Schulz, 1993; *Poecilia melanogaster*, Römer y Beisenherz, 1996) viéndose por el contrario favorecida la diferenciación sexual de hembras a bajas temperaturas. Modelo observado en la mayoría de las especies de peces analizadas.

- En el pez gato, las altas temperaturas favorecieron la proporción hacia hembras (Patiño et al., 1996).
- Tanto temperaturas extremas bajas como altas favorecen las poblaciones de sólo machos, mientras que las temperaturas intermedias proporcionan mayor número de hembras. Este patrón de desarrollo sólo se ha visto en el falso halibut del Japón, *Paralichthys olivaceus* (Yamamoto, 1995).

El estudio de los efectos que algunos contaminantes ejercen sobre este enzima en moluscos (Morcillo, 1998), así como en folículos del ovario del salmón (Afonso et al., 1997), permite emplear la inhibición de la aromatasa como indicador de la presencia de contaminantes en el medio acuático.

Actividad aromatasa y receptores de esteroides sexuales

La presencia de actividad aromatasa en el cerebro de los vertebrados plantea la pregunta de si los receptores de esteroides sexuales están localizados en las mismas áreas del cerebro que el enzima y si varían también a lo largo del año. En el cerebro del pez dorado, por ejemplo, la abundancia del receptor de andrógeno (AR) y la actividad aromatasa mostraron sus máximos en el momento que coincidía con la época de puesta, mientras que los niveles mínimos de actividad aromatasa y de abundancia de AR correspondieron a la inactividad reproductiva (Pasmanik y Callard, 1988a). En aves se ha observado coexpresión del receptor de estrógeno (ER), de AR y de actividad aromatasa en las mismas áreas del cerebro, sugiriendo la posibilidad de una regulación de actividad aromatasa dependiente de esteroide e indicando un papel de control a la aromatasa en los procesos dependientes de AR y ER (Metzdorf *et al.*, 1999). En el cerebro de la musaraña, *Suncus murinus*, existe también colocación de actividad aromatasa y AR en áreas específicas del cerebro, y se ha sugerido que en ambos sexos AR puede actuar como un factor de transcripción para regular la aromatasa (Veney and Rissman, 2000). En el

cerebro de trucha y pez cebra no se encontró colocalización de expresión de aromatasa y ER por técnicas de inmunohistoquímica ni hibridación *in situ*. Por el contrario, con RT-PCR y cultivos monocapa primarios de células gliales se consiguió observar presencia de mensajeros de aromatasa y de ER (Menuet et al., 2002).

Rol de la aromatasa en el ciclo ovárico durante la vitelogénesis y maduración final

En el modelo aceptado de los dos tipos celulares implicados en la esteroidogénesis gonadal, la aromatasa se encuentra localizada en la capa granulosa para transformar la testosterona (producida en la teca) en estradiol (Nagahama, 1983). Éste último, junto con la $17\alpha,20\beta$ -dihidroprogesterona, son los responsables del crecimiento y maduración del oocito en salmónidos. Por tanto, la ruta esteroidogénica cambia dramáticamente de producir estrógenos (C_{18}) a progestágenos (C_{21}) inmediatamente antes de la maduración del oocito en el folículo del ovario. Este brusco cambio es un requisito para que el crecimiento del oocito entre en la fase de maduración (Nagahama, 1988).

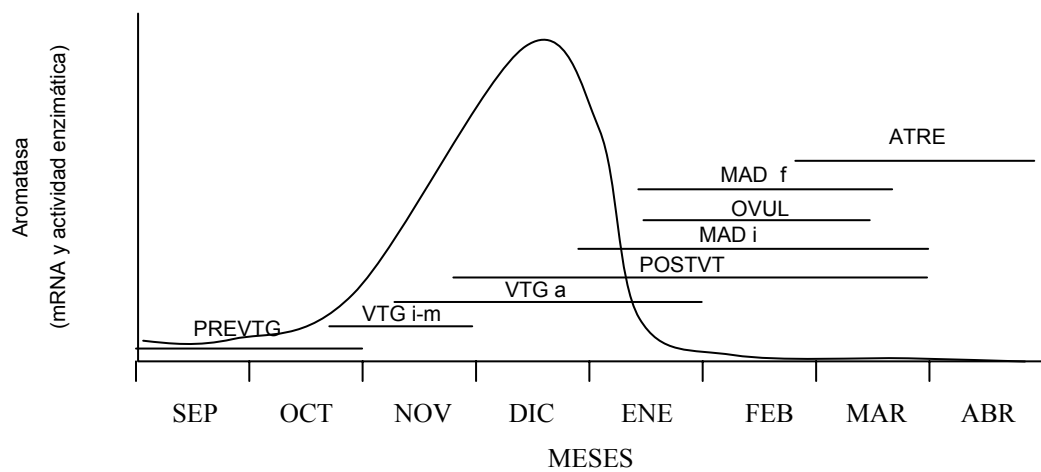


Fig. 8. Superimposición del patrón de expresión del mRNA de la aromatasa, así como de la actividad enzimática en peces teleósteos durante el ciclo reproductor a la evolución de la vitelogénesis en la lubina. PREVTG: previtelogénesis, VTG i-m: vitelogénesis inicial-media; VTG a: vitelogénesis avanzada; POSTVTG: postvitelogénesis; MAD i: maduración inicial; MAD f: maduración final; OVUL: ovulación; ATRE: atresia). Datos de mRNA y actividad aromatasa de Young et al., 1983; Chang et al., 1997. Datos de vitelogénesis de la lubina de Asturiano et al., 1997.

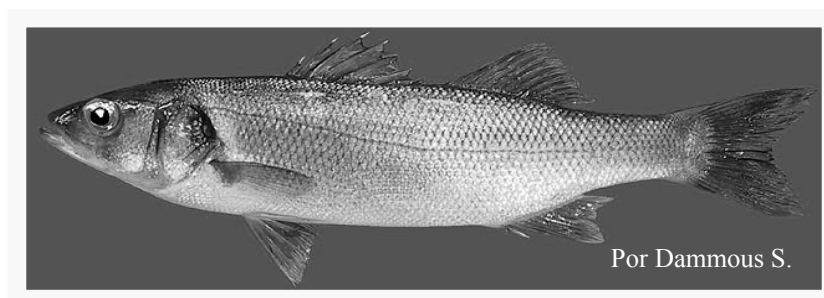
Cambios con la actividad aromatasa en la capa de granulosa de los folículos ováricos del salmón amago indicaron que la transformación de testosterona en estradiol aumentaba progresivamente durante el periodo de la vitelogénesis con un pico al final de la misma y una brusca caída posterior a la vitelogénesis, al igual que ocurría al final de la maduración del oocito y en los folículos postovulatorios (Young *et al.*, 1983). Del mismo modo, en los folículos ováricos de la tilapia del Nilo, los niveles de mRNA de P450arom y la proteína fueron bajos durante la vitelogénesis primaria, altos durante la vitelogénesis e indetectables tras la vitelogénesis y maduración del oocito. Estos cambios del mRNA de la P450arom se correlacionaron con los de los folículos de la trucha arco iris, así como con los cambios en la proteína y actividad aromatasa (Chang *et al.*, 1997). Debido a que el estradiol-17 β , el estrógeno vitelogénico más importante estimulador de la producción de vitelogenina en el hígado, es la precursora de las proteínas del huevo (Mommsen y Walsh, 1988), es lógico observar correlación de los niveles plasmáticos de estradiol con los cambios de la actividad aromatasa a lo largo del desarrollo ovárico. La figura 8 muestra la posible evolución de la actividad aromatasa en la lubina en relación a lo diferentes estadios de la vitelogénesis.

La lubina

Taxonomía y hábitat

Tradicionalmente, la lubina era clasificada dentro de la familia Serranidae caracterizada, entre otros aspectos, por incluir especies hermafroditas de aguas templadas. Sin embargo, era la única especie de esta familia que era claramente gonocorista. Por consiguiente, en los últimos años se ha incluido dentro de la familia Moronidae, formada sólo por especies gonocoristas (Nelson, 1994). Pertenece a la clase Actinopteria, orden Perciformes, familia Moronidae, género *Dicentrarchus* y especie *labrax*. La lubina se puede encontrar en la zona litoral, diferentes fondos de estuarios, lagunas y

ocasionalmente en ríos. Durante el verano se acerca a la costa y las bocas de los ríos pero en inviernos se aleja a aguas profundas. En el estadio juvenil se muestran más gregarios que de adultos. Su reproducción tiene lugar una vez al año. En el Mediterráneo, se da alrededor de los meses de invierno (Diciembre-Marzo). La fertilización de los huevos es externa y también son gregarios a la hora de la puesta. Tras ~3 días se produce la eclosión del huevo cuyo peso seco es de ~60 μg , aumentando a 10 mg en la metamorfosis. El periodo de larva tiene una duración de 46 días a 16,5°C (Houde y Zastrow, 1993).



Fisiología del desarrollo y reproducción

La lubina es una especie importante para investigación tanto básica como aplicada. Los primeros estudios sobre su crecimiento, sexualidad y biología se centraron en estudiar la morfología, tanto del cuerpo como de las gónadas, el desarrollo gonadal, la gametogénesis y el desove en las zonas rocosas litorales (Barnabé, 1973; Barnabé, 1976). La fecundidad es exógena y el número de huevos por periodo de puesta oscila entre 300.000 y 600.000 (Navas et al., 1993). Existen evidencias de que las hembras crecen más que los machos (Carrillo *et al.*, 1995). En consecuencia, hay un gran interés en producir lotes con dominancia de hembras para la acuicultura, pero para ello es necesario entender el proceso de determinación y diferenciación sexual (Fig. 9) de dicha especie (Piferrer et al., 1995). Además, se caracteriza por tener un largo periodo en el que las

gónadas permanecen indiferenciadas, 150 días en hembras y 250 en machos (Fig. 9). Tanto en poblaciones naturales (Roblin y Bruslé, 1983) como en cautividad (Blázquez *et al.*, 1995) es posible encontrar machos que poseen oocitos intratesticulares (ovotestes), indicativo de una cierta labilidad sexual, que puede manifestarse durante el desarrollo sexual y verse influida la proporción de sexos. De hecho en la lubina la proporción de sexos en cautividad suele ser 3:1, siempre favorable a machos (Carrillo *et al.*, 1995; Colombo *et al.*, 1997). El desarrollo ovárico es de tipo sincrónico y hay hembras que realizan más de una puesta por año, aunque la primera es la de mejor calidad (Carrillo *et al.*, 1995; Asturiano *et al.*, 1997). Los niveles plasmáticos de vitelogenina varían a lo largo del año y se correlacionan con niveles de estradiol, crecimiento del oocito y coinciden con la época de puesta, aumentando progresivamente desde septiembre para alcanzar sus máximos en febrero y descender después a niveles basales alrededor de mayo (Mañanós *et al.*, 1997). Sobre esta especie también se han realizado estudios sobre los niveles de esteroides sexuales a lo largo del año (Prat *et al.*, 1990) y, más recientemente, estudios en el principio de la pubertad y la capacidad esteroidogénica de las gónadas de juveniles de lubina (Rodríguez *et al.*, 2000b). Asimismo, la hipófisis es capaz de sintetizar y secretar gonadotrofinas incluso antes de la diferenciación sexual (Rodríguez *et al.*, 2000a; González-Martínez, *et al.*, 2001). En referencia a la determinación sexual, los test de progeñe con peces cambiados de sexo no confirmaron un sistema de determinación sexual XX/XY o ZW/ZZ (Blázquez *et al.*, 1999). Se cuestionaba un sistema poligénico para la determinación sexual debido a la consistencia de la proporción de sexos en condiciones de cultivo. Tampoco se pudieron detectar secuencias de ADN específicas del sexo cuando se aplicaron técnicas de hibridación substractiva (Martínez *et al.*, 1999). Por otro lado se ha conseguido la inducción a la triploidía y ginogénesis con un 100% de efectividad (Felip *et al.*, 2001).

Debido a la inestabilidad mencionada, la proporción de sexos se puede ver afectada por los factores ambientales. En cuanto al efecto del fotoperiodo no se obtuvieron efectos

sobre la proporción de sexos (3:1) (Blázquez *et al.*, 1998). Sin embargo, al igual que ocurre en reptiles y otros peces, la temperatura es capaz de alterar la proporción de sexos (Blázquez *et al.*, 1998; Pavlidis *et al.*, 2000; Koumoundouros *et al.*, 2001; Koumoundouros *et al.*, 2002; Saillant *et al.*, 2002). Sin embargo, a pesar del papel demostrado de la aromatasa en la diferenciación sexual, no existen trabajos sobre el efecto de la temperatura sobre la expresión del gen de la aromatasa ni sobre la actividad enzimática. Por ello, sería interesante estudiar estos efectos para conocer si el efecto de la temperatura sobre la proporción de sexos viene mediada a través del enzima aromatasa.

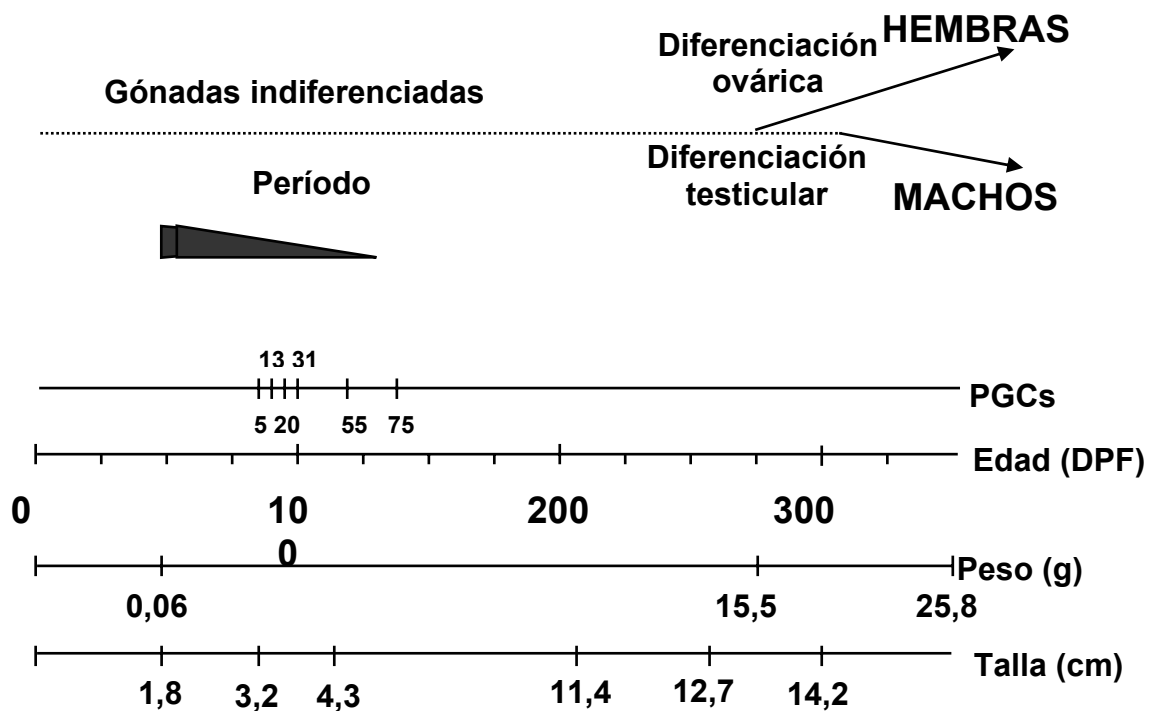


Fig. 9. Esquema de la diferenciación sexual en la lubina. Se señala el número de células primordiales germinales (PGCs) por sección, la edad, el peso y la talla a la que tiene lugar la diferenciación gonadal tanto masculina como femenina. P.L. = período lábil. Datos de Roblin y Bruslé, 1983 y Blázquez *et al.*, 2001.

Estudios previos en el cerebro de la lubina incluyen la distribución de la hormona liberadora de gonadotrofinas de salmón (sGnRH) (Kah *et al.*, 1991), la expresión de tres formas de GnRH (González-Martínez *et al.*, 2001), el contenido de sGnRH y otras formas en el cerebro y la hipófisis (Kah *et al.*, 1994; Zanuy *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2000a), la distribución de neurotransmisores (Batten *et al.*, 1993), y la expresión del neuropeptido Y (NPY) (Cerdá-Reverter *et al.*, 2000). Sin embargo, la implicación del cerebro en otros procesos que requieren síntesis de estrógenos como, por ejemplo, durante la diferenciación sexual (González y Piferrer, 2000) es aún objeto de debate (Francis, 1992; Kwon *et al.*, 2001).

En conjunto, los estudios mencionados sobre varios aspectos de su reproducción demuestran que la lubina es un modelo de investigación consolidado. Teniendo en cuenta la importancia de la aromatasa en la reproducción y diferenciación sexual, se considera interesante y necesario el estudio de este enzima. Sin embargo, teniendo en cuenta la relevancia de los enzimas esteroidogénicos en general y de la aromatasa en particular, no existía ningún estudio sobre ninguno de estos enzimas en esta especie (incluso en otros peces son escasos).

Objetivos

A pesar de que la lubina, tal y como se ha mencionado, ha sido objeto de numerosos trabajos sobre su cultivo, desarrollo y reproducción, aún no se conoce bien su mecanismo de determinación y diferenciación sexual. Por ello, y debido a la importancia de la aromatasas en este proceso, así como en la síntesis de neuroestrógenos, el objeto global de esta investigación fue el estudio de la actividad aromatasas en la lubina. Los objetivos específicos fueron:

1. Puesta a punto y validación de un método para medir la actividad aromatasas en la lubina. En esta investigación se pretendía optimizar las condiciones del ensayo más empleado, el método del agua tritiada, para determinar la actividad en nuestra especie de interés. Era importante poner a punto este método, especialmente debido al riesgo que existe de medir pseudo-aromatasas si se pretende detectar niveles bajos de la actividad de dicho enzima. Para ello, se tomó en cuenta, por primera vez en este tipo de análisis en peces, todas las variables que le son propias: temperatura y tiempo de incubación, concentración de tejido fresco, sustrato y cofactores, pH y molaridad del tampón, así como un análisis de su especificidad, localización subcelular y confirmación del ensayo con el método directo de medida de estrona.

2. Determinación de las propiedades catalíticas de la aromatasas de la lubina.

Con el método puesto a punto y validado, y basado en que existen dos isoformas en algunas especies de peces, se planeó comprobar la existencia de dos actividades catalíticas del enzima. Además sólo existían estudios transfectando células COS o CHO (Trant et al., 2001; Zhao et al., 2001) pero no con el enzima nativo ni para ninguna especie marina como se analiza en este trabajo. Las propiedades catalíticas comprendieron la constante de afinidad (K_m) y la velocidad de reacción (V_{max}).

3. Distribución de la actividad aromatasa

Si bien es conocida la distribución de actividad aromatasa en mamíferos, en vertebrados inferiores sólo se había estudiado en algunas especies y en pocos órganos. Por ello, en este trabajo se analizó dicha actividad enzimática en diversos órganos. Igualmente, era importante estudiar la distribución neuroanatómica, puesto que se había demostrado la excepcional actividad aromatasa en el encéfalo de algunos teleósteos.

4. Cambios de la actividad aromatasa con el ciclo reproductor

Debido a la importancia demostrada de la actividad aromatasa en el balance entre andrógenos y estrógenos y la implicación de éstos en la reproducción, se estudiaron los cambios de la actividad aromatasa a lo largo del año y correlacionaron con el estadio reproductor, así como con los niveles de esteroides sexuales en plasma.

5. Actividad aromatasa durante los primeros estudios del desarrollo y la diferenciación sexual

La existencia de estudios que muestran la implicación de la actividad aromatasa en el proceso de diferenciación sexual motivo el estudiar su distribución a lo largo del primer año de vida y en función del sexo, para intentar averiguar el posible rol de este enzima en el mencionado proceso de la lubina.

6. Por último, mencionar que durante el transcurso de la validación del método de agua tritiada surgió una nueva pregunta originalmente no planteada sobre la regulación de la actividad aromatasa. En relación con el metabolismo de la androstenediona, se estudiaron los posibles efectos de los andrógenos 11 β -hidroxilados sobre la actividad aromatasa en el cerebro y ovario de la lubina.

CAPÍTULO II

CHARACTERIZATION OF AROMATASE ACTIVITY IN THE SEA BASS. EFFECTS OF TEMPERATURE AND DIFFERENT CATALYTIC PROPERTIES OF BRAIN AND OVARIAN HOMOGENATES AND MICROSOMES

González, A., and Piferrer, F. (2002). Characterization of aromatase activity in the sea bass. Effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *J. Exp. Zool.* 293: 500-510.

Abstract

Two aromatase genes have been discovered in the brain and ovary of some teleosts. However, data on native aromatase enzyme kinetics and thus actual catalytic activity are scarce in fish, impeding comparison of aromatase activity (AA) from different organs within and between species. In the present study, the tritiated water assay was optimized and validated to measure AA in the sea bass using 1β -[^3H]-androstenedione as a substrate in crude homogenates and microsomes. Optimized assay variables included pH, temperature, buffer strength, incubation time, amount of fresh tissue, substrate and cofactor concentration. Specificity of the assay was verified by using known inhibitors, inappropriate substrates and heat-inactivation. Subcellular fractionation revealed ten-fold more activity in the microsomal over the cytosolic fraction. The assay was also validated by comparing results from the direct product isolation method. The validated assay described allows measurement of AA to levels as low as <10 fmol/mg protein/hr. Sex differentiation is temperature-dependent in the sea bass. It was found that in the physiological range of temperatures where the sea bass can live, 10-30°C, AA is highly dependent on temperature in a linear fashion (brain: $r^2 = 0.92$; $P < 0.001$; ovary: $r^2 = 0.94$; $P < 0.001$). When AA levels from brain and ovarian homogenates obtained from the same fish during the spawning season were compared, the respective Michaelis-Menten constant (K_m) values were 7.3 nM vs 4.6 nM, with no significant differences detected between the two tissues. Thus, sea bass aromatase has a very high affinity for androstenedione, similar to what has been found in goldfish, but much higher than other piscine or mammalian aromatases (30-435 nM). In contrast, the brain maximum reaction rate (V_{\max} 7.8 pmol/mg prot/h) was 4-fold higher ($P < 0.001$) than the ovarian V_{\max} (2.1 pmol/mg prot/hr). Consistent results were found using purified microsomes. Although this is the first time that the kinetic parameters are reported for a native piscine aromatase in two different tissues within the same fish, it remains to be determined whether this is a reflection of two distinct isoforms in this particular species.

Introduction

The enzyme responsible for the conversion of androgens into estrogens is a complex, which includes an NADPH-dependent cytochrome P450 reductase and a cytochrome P450 aromatase, a product of the CYP19 gene (Simpson et al., '94). Aromatase enzyme activity per unit of protein is exceptionally high in the teleost brain, in the range of 100-1,000 times the activity typical of the mammalian brain (Callard et al., '93). The significance of this high constitutive aromatase activity in neural tissues in teleosts is still not understood. Like in other vertebrates, piscine aromatase is implicated in sex steroid feedback and in regulating key events during the ovarian cycle, and thus aromatase activity is concentrated in the “reproductive” brain and in the pituitary gland (Callard et al., '81 and Timmers et al., '87). However, its involvement in other events that require estrogen synthesis, such as during the process of sex differentiation (González and Piferrer, 2000) is currently the subject of intense research.

It is believed that the balance between androgens and estrogens in some species, particularly in those of “lower vertebrates”, influences the process of sex differentiation. Although the possible role of aromatase activity in sex differentiation needs to be further investigated, there is an increasing number of studies that show that, by virtue of the fact that aromatase is at the end of the gonadal steroidogenic pathway, aromatase can act as the switch controlling androgen vs. estrogen production and thus the process of sex differentiation (Jeyasuria and Place, '98). Sexually undifferentiated genotypic females of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) treated with a specific aromatase inhibitor developed as phenotypic males, demonstrating the importance of aromatase in sex differentiation (Piferrer et al., '94). Similar results have been obtained in rainbow trout (*O. mykiss*; Guiguen et al., '99), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*; Kitano et al., 2000) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*; Baroiller et al., '95; Kwon et al., 2000). Recently, it has been shown that in Nile tilapia, a species with both genetic and

environmental sex determination, aromatase plays a decisive role in ovarian differentiation while its repression appears to be necessary for male differentiation (Kwon et al., '01; D'Cotta et al., '01).

The sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is an important species for both fundamental and applied research, and there is interest in understanding the control of the process of sex differentiation. Both natural (Roblin and Bruslé, '83) and captive populations (Blázquez et al., '95) are characterized by males that exhibit intratesticular oocytes (ovotestes), a reflection of a certain sexual lability. This lability, in turn, may indicate certain instability during sexual development and allow for the effects of environmental factors to influence sex. In this regard, Blázquez et al., ('98) and Pavlidis et al., (2000) have shown that, like in reptiles and other teleosts, temperature can affect sex ratios in the sea bass. In addition, this species is characterized by exhibiting a long period in which the gonads remain sexually undifferentiated. In contrast, the pituitary gland is able to synthesize and secrete gonadotropins much earlier (Rodríguez et al., 2000). The annual levels of sex steroids during the reproductive cycle have been described (Prat et al., '90) and, more recently, studies on the onset of puberty and the steroidogenic capabilities of the gonads of juvenile sea bass have been carried out (Rodríguez et al., 2000). However, to the best of our knowledge, not a single steroidogenic enzyme has been studied in this species. Taken together, it thus becomes apparent the interest of studying aromatase in this species, since it can act as switch in the process of sex differentiation (Piferrer et al, '94) and also as a key component in any plausible mechanism involving cross-talk between the developing gonads and the brain (Kwon et al., 2001).

In teleosts, two distinct isoforms of aromatase, one in brain (P450aromB) and another in ovary (P450aromA) have been identified in goldfish, *Carassius auratus* (Tchoudakova & Callard, '98), tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cruz and Canario, 2000) and zebrafish, *Danio rerio* (Kishida & Callard, 2001) based on DNA sequences of expressed genes in

these organs. However, the important question of whether both isoforms are actually enzymes with different catalytic properties has only recently been investigated, but it is not known whether results in goldfish can be extrapolated to other fish (Zhao et al., 2001). For that purpose, usually transfected cells, e.g., COS, CHO cells are used. However, due to the known expressed 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activity of COS cells (Trant, '94), results can tell whether a particular sequence actually codifies for aromatase, but they cannot accurately tell if both forms have the same or distinct catalytic activities. This is not the case with CHO cells, especially if expression is verified by immunoprecipitation (Zhao et al., 2001). Alternatively, the catalytic properties can be measured with preparations of the native enzyme.

As a first step, the study of aromatase activity in the sea bass, the tritiated water release assay has been optimized and validated in this paper. In this assay, first described by Osawa and Spaeth, ('71), aromatase activity is measured by the stereospecific loss of the 1β - ^3H of the substrate into the aqueous phase of the reaction mixture during aromatization (Lephart and Simpson, '91). This assay has also been used in fish (e.g., Antonopoulou et al., '95). Its major advantage is that it is relatively simple to perform, but it can give false results when used for detecting low levels of activity or when it is not thoroughly validated (Prefontaine et al., '90).

Therefore, the objective of this study was first to set up and validate the tritiated water assay (Osawa and Spaeth, '71) to catalytically characterize sea bass aromatase enzyme activity. The validated assay was then used to determine the kinetics of this enzyme in the sea bass and also to determine whether two different catalytic activities could be detected in the brain and ovary.

Materials and methods

Fish

Adult sea bass (200 to 700 g body weight [BW]) were purchased from a commercial fish farm (Blanes Peix, S.A., Blanes, NE Spain). Fish were maintained in floating net pens under natural conditions of temperature and photoperiod and were fed once a day with pelleted food of the appropriate size (Proaqua, Palencia, Spain). Sacrifice was by decapitation after fish were numbed in ice-chilled water. Brain and gonads were obtained either immediately after or within 2 hr of sacrifice. In the latter case, fish were kept in a mixture of ice and ice-chilled seawater. Tissue samples were transported to the laboratory on ice and were then either used immediately or frozen at -80°C. Similar to what had been observed in other systems, preliminary tests showed that sea bass aromatase activity is not affected by freezing. Likewise, preliminary tests showed that activities were the same when tissues were excised right after killing or when taken out 2 hr after sacrifice. Experiments were usually carried out with males (the most readily available sex in sea bass). Females were used when activities were compared between brain and ovary on a fish-by-fish basis.

Radioisotopes and Reagents

[1 β -³H]-androstenedione (specific activity 23.1-28.5 Ci/mmol; New England Nuclear [NEN] Boston, MA) was repurified prior to use by thin layer chromatography (TLC) on silica gel plates using twice ether-hexane (3:1, v/v). Authentic tritiated water (³H₂O) was obtained from NEN. Organic solvents for TLC and for steroid extraction were of analytical grade and were acquired, along with TLC plates, from Merck (Barcelona, Spain). Other reagents and carrier steroids were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Aromatase assay

Aromatase activity (AA) was determined with the tritiated water assay and validated by comparing results with the product isolation method. For the tritiated water assay, [1β - ^3H]-androstenedione was first preincubated at 37°C for 30 min with a NADPH-generating system consisting of 1 mM NADP sodium salt, 10 mM glucose-6-phosphate dipotassium salt, and 2 IU/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase (type XI). Usually, for each preparation brains from 2-3 animals were used. After dissection tissues were homogenated (1:10, wet weight/vol) in chilled 50 mM potassium phosphate buffer (PB), pH 7.4, containing 250 mM sucrose and 10 mM dithiothreitol (DTT). Homogenizations were performed on ice using three, 5-sec bursts of the Polytron (PT 1200 Kinematica, Luzern, Switzerland) separated by 10 sec intervals. The incubation proper had a total volume of 0.4 ml and, unless otherwise stated, lasted 30 min and was performed at 30°C in a water bath with gentle shaking. Details of each experiment are given in the figure legends. Controls always included omission of substrate (tissue control) or tissue (substrate control) to calculate background activity, as well as the use of authentic tritiated water to calculate recovery. To determine the intra-assay error, eight replicates of the same homogenate were assayed in the same experiment. Aliquots of the same homogenate were also tested in different experiments (each time in quadruplicate) to determine the inter-assay error. Other controls used included heated samples, omission of cofactors, and addition of specific inhibitors of aromatase activity such as Fadrozole (Novartis, Barcelona, Spain). Incubations were terminated by placing the tubes on crushed ice and by the immediate addition of trichloroacetic acid (TCA; final concentration 10%). Five minutes later, samples were centrifuged for 5 min to precipitate the pellet containing the proteins. The supernatant was extracted with three volumes of chloroform and centrifuged. The aqueous phase was mixed with dextran coated (0.5%)

charcoal (5%), centrifuged, and an aliquot of the supernatant counted for 2 min in a Liquid Scintillation Counter.

For the product isolation method (Prefontaine et al., '90), the incubation was similar except that 7-³H-androstenedione (NEN) was used as a substrate. Incubations were stopped by the addition of two volumes of dichloromethane. Samples were extracted three times, the organic fraction evaporated and the residue resuspended in two vol. of ethanol, evaporated again and resuspended in dichloromethane. Carrier steroids were added for reference. Samples were then chromatographed for 45 min twice in ether:hexane (3:1, v/v), and corresponding areas scraped. The silica gel was dissolved in 3 ml of methanol, centrifuged and the solvent collected to measure radioactivity. The last process was repeated three times.

Protein determination

The TCA-insoluble pellet was washed with distilled water and solubilized with 0.2 N NaOH in a water bath with shaking for 1 h at 55°C. Proteins were determined in aliquots by the Lowry method (Lowry et al., '51) using BSA as standard. Samples were read in a microplate reader (Biotek Instruments, Inc., Winooski, VT) at 630 nm.

Data analysis

All experiments were repeated at least three times. Within each experiment, three or four replicate determinations were used for each datapoint. Values are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The radioactivity obtained (dpm) was multiplied by the dilution factor and the background subtracted to obtain total dpm, which were corrected with the tritiated water control for procedural losses. Aromatase activity was corrected by the amount of protein and time and usually expressed as pmol/mg protein/hr. The V_{max} and K_m were calculated from Lineweaver-Burk inverse plots as in Hutchison et al., ('90), Ackerman et al., ('81) and Nakajin et al., ('86). Differences between treatments

were analyzed by ANOVA or Student's *t*-test (Sokal and Rohlf, '81). Post ANOVA comparison of means was carried out using the Duncan's Multiple Range test. Differences were accepted as significant when $P < 0.05$.

Results

Preliminary experiments were conducted in order to roughly estimate the range of values of some key assay variables such as amount of tissue, substrate concentration and incubation time. The results below are arranged to facilitate the understanding of the rationale behind the validation of the assay and thus they do not necessarily reflect the order in which the experiments were conducted.

Effects of pH of buffer, temperature of incubation and strength of assay buffer

Variations in any of these three variables resulted in substantial changes in aromatase activity. Brain AA was significantly higher when the pH was in the range between 7 and 9 ($P < 0.01$, with respect to most other pH values), and peaked between 7 and 8 (Fig. 10A). Similarly, maximum AA both in brain and ovary was obtained with incubation temperatures of 30 and 40°C ($P < 0.001$, with respect to other tested temperatures) (Fig. 10B, C). Between 10°C and 30°C, the range of temperatures where sea bass live (Pickett and Pawson, '94), AA was temperature-dependent in a linear fashion (brain: $r^2 = 0.92$; $P < 0.001$; ovary: $r^2 = 0.94$; $P < 0.001$). With regard to buffer strength, brain aromatase activity progressively increased with molarity up to 50 mM and sharply declined with higher molarities (Fig. 10D). Thus, subsequent validation of the tritiated water assay for the sea bass was carried out using the following conditions: buffer strength 50 mM, pH 7.4 and incubation temperature 30°C. This temperature is located in the upper range of water temperatures suitable for sea bass (Pickett and Pawson '94).

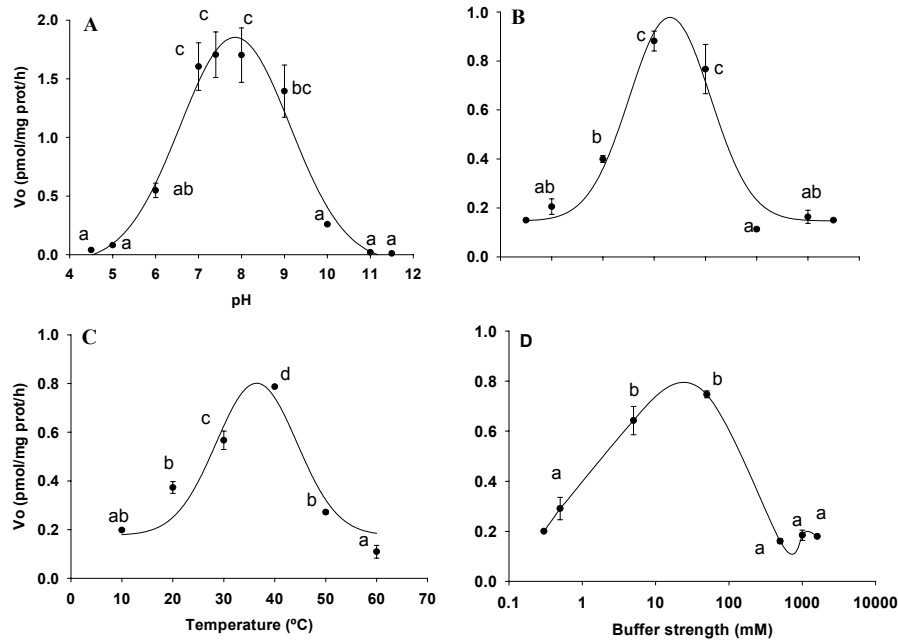


Fig. 10. Optimization of assay conditions. Effects of pH (A), incubation temperature (B and C) and buffer strength (D) on sea bass brain (A, B and D) and ovarian (C) aromatase activity. In all cases, 10 mg fresh tissue was incubated with substrate at 150 nM for 30 min. Assay conditions. A: temperature, 30°C; buffer strength, 50 mM. B and C: pH 7.4; buffer strength, 50 mM. D: pH 7.4; temperature 30°C. Different letters indicate significant differences ($P < 0.001$) between datapoints.

Effect of amount of tissue and time of incubation

The tritiated water assay requires linear correlation between some independent variables (amount of tissue homogenate or incubation time) and the dependent variable measured (aromatase activity). Different amounts of fresh tissue (5-20 mg) and incubation times (0-30 min) were tested. Results showed that at each tested incubation time, AA was

proportion to the amount of tissue (Fig. 11). For example, with incubations of 30 min, AA augmented with increasing amounts of tissue (linear regression ; $r^2 = 0.99$; $P < 0.01$). Conversely, within each tissue amount, AA was proportional to the incubation time up to 30 min (but see next paragraph) and, in all cases, the regression lines passed through the

origin, indicating, as it should, lack of measured activity when the incubation time was zero minutes. Ten milligrams of fresh tissue were chosen for the rest of the assay validation.

Fig. 11. Effects of tissue concentration and incubation time on sea bass brain aromatase activity. In all cases, substrate was present at 150 nM and incubations were carried out at 30°C.

Validation of the method

The product isolation method was used to validate the tritiated water assay. Brain aromatase activity was determined at different incubation times by either the tritiated

water assay or the direct measure of estrone. With incubations up to 30 min, the activity measured by both methods was very similar (Fig. 12).

Fig. 12. Application of the product isolation method to validate the tritiated water assay method to measure aromatase activity. In the former method, 7- ^3H - Δ^4 was used as substrate and the main radioactive product (estrone) was identified by TLC. In the latter method, the substrate was 1 β - ^3H - Δ^4 . Different incubation times up to 60 min were tested.

However, with incubations of 60 min, the two methods gave different results, although because of high sample variability there was no statistically significant differences. Nevertheless, in subsequent experiments, the incubation time with the tritiated water assay was set at 30 min.

Concentration of cofactor

Since AA is NADPH-dependent, a NADPH-generating system is required when using tissue homogenates. These were preferred over tissue fragments because of lower sample variability and thus higher assay precision. Several concentrations of NADP were tested, ranging from 0.01 to 1,000 μM . Glucose-6-phosphate was at a concentration ten-fold higher than that of NADP during the preincubation period. This ensured the transformation of all NADP into NADPH, thus preventing the inhibition of aromatase activity by NADP (Thompson and Siiteri, '74). Brain aromatase activity significantly increased with concentrations of NADP up to $\approx 100 \mu\text{M}$ and remained essentially constant thereafter (Fig. 13). However, in order to ensure that NADP was always at a saturating concentration and thus not limiting aromatase activity regardless of amount of substrate, in the following experiments, a ten-fold excess (i.e., 1 mM) was used (Prefontaine et al., '90).

		b	b
		b	b
b			
b			
ab			
ab			
a			
a			
a			
a			

Fig. 13. Optimization of assay conditions to determine sea bass brain aromatase activity. Effect of different concentrations of NADP on the tritiated water assay. All other components of the NADPH-generating system were maintained constant (glucose-6-phosphate at 10 mM and glucose-6-phosphate dehydrogenase at 2 IU/ml). Substrate was added at 150 nM to 10 mg fresh tissue and incubations lasted 30 min. Different letters indicate significant differences between datapoints ($P < 0.001$).

Assay specificity and accuracy

In the absence of tissue, recovered radioactivity in the aqueous fraction represented, on average, only 0.06% of the original radioactivity of the substrate. The inter-assay and intra-assay error was 8.7% and 7.3%, respectively. Furthermore, recovery of tritiated water in the presence of homogenate but in the absence of substrate was typically 95% of the amount originally added. Together, both figures indicate very good solvent extraction. Similarly, the maximum amount of ethanol (0.4%) used as solvent and present in some treatments did not affect AA, nor did the presence of excess of reaction product (15 μ M E₁) (Fig. 14). In contrast, the addition of a specific aromatase inhibitor (Fadrozole), the preheating of samples or the use of the wrong substrate for the tritiated water assay (1,2,6,7-³H-T, 7-³H- Δ^4 or ³H-E₁) reduced AA to 23%, 7% and \approx 5% of the control value, respectively (Fig. 14). Further, in the latter case, recovered radioactivity was not different from the background level. Omission of 6-phosphate-dehydrogenase reduced AA to 65% but this value was not statistically significant from the control value. As expected, Fadrozole acted by blocking the enzyme. In the same way, preheating samples provoked the denaturalization of the enzyme and the subsequent loss of activity. Likewise, the lack of the glucose-6-phosphate dehydrogenase blocked the transfer of H⁺ (from the glucose-6-phosphate) to the NADP to make NADPH, resulting in a partial inhibition of the aromatase from the NADP. When the 7-³H Δ^4 was used as a substrate, it was not converted to ³H₂O because the tritiated carbon ends up in the main product (estrone). The negative control using ³H-E₁ as a substrate resulted, as expected, in a value not different from the background. Finally, when 1,2,6,7-³HT was used as a substrate, the results obtained were in accordance to what one would expect taking into account that, according to the information provided by the manufacturer, carbon 1 of this molecule contains only

one quarter of the total tritium label and, within this carbon, 77% of the label is in the β position and the remaining 23% in the α position.

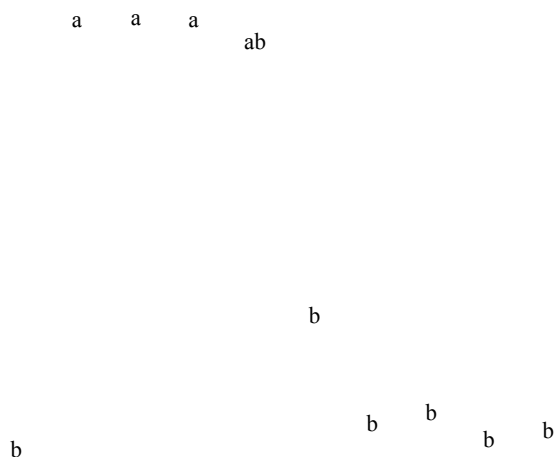


Fig. 14. Specificity of the tritiated water assay to determine aromatase enzyme activity in the sea bass after incubation with 1β - ^3H -androstenedione at 150 nM (CTRL). Treatments to test assay specificity included: omission of the tissue, i.e., substrate control which provides the background (BG) value; ethanol control (CTRL EtOH) to account for possible effects of this solvent on AA; excess of reaction product (estrone; E_1); omission of glucose-6-phosphate dehydrogenase ($-\text{H}^+$); specific inhibitors of aromatase enzyme activity, e.g., Fradrozole (CGS); preheating of samples (HEAT); and inappropriate substrates for this assay such as 1,2,6,7- ^3H -Testosterone (^3HT), 7- ^3H -Androstenedione ($^3\text{HA}^4$) and ^3H -Estrone ($^3\text{HE}_1$). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$) between datapoints.

Subcellular localization

Different subcellular fractions were obtained by selective centrifugation according to previously published protocols (Callard et al., '77) in order to study brain AA distribution in the different cellular components. Tissue fragments (incubated without cofactors), crude homogenates and the mitochondrial, nuclear, microsomal and cytosolic fractions were tested. The highest aromatase activity (Fig.15) was located in the microsomal fraction ($P < 0.01$, with respect to all other treatments), and, in contrast, it was insignificant in the cytosol fraction, as expected, and three times higher in crude homogenates than in fragments. The mitochondrial and nuclear fractions had some activity, but about three times lower than that of the microsomal fraction.

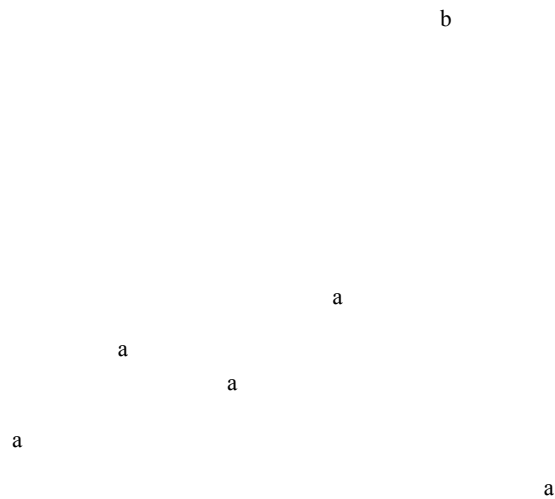


Fig. 15. Subcellular distribution of aromatase activity in the sea bass brain. The brain was cut into fragments (FRA) and tested directly or processed in K-phosphate buffer (50 mM) containing sucrose (250 mM), DTT (10 mM) and $MgCl_2$ (3 mM) to obtain a crude homogenate (HOM). Different subcellular fractions were obtained by the subsequent centrifugations of the homogenate: 850 x g x 10 min, giving pellet 1 and supernatant 1. Pellet 1 was resuspended in buffer containing sucrose 2 M and centrifuged at 51,000 x g x 45 min, giving pellet 2 = nuclei (NUC) and supernatant 2 (discarded); supernatant 1 was centrifuged at 11,500 x g x 30 min, giving pellet 3 and supernatant 3. Pellet 3 was washed once and centrifuged again at 11,500 x g x 30 min, giving pellet 4 = mitochondria (MIT) and supernatant 4 (discarded); supernatant 3 was centrifuged at 100,000 x g x 60 min giving pellet 5 = microsomes (MIC) and supernatant 5 = cytosol (CYT). Different letters indicate significant differences at $P < 0.01$.

Effect of substrate

Once assay conditions (incubation temperature, buffer strength and pH, amount of tissue, incubation time, and cofactor concentration) were set, the effect of substrate concentration was studied in order to ensure saturating amounts available for the enzyme. Aromatase activity became saturated with substrate concentrations at ~100 nM and above (Fig. 16A, B, C, D). Thus, to ensure always that the substrate was not limiting, 150 nM was used as the standard concentration thereafter.

Table 2. Catalytic activity (V_{max}) and affinity constant (K_m) of sea bass aromatase with 1β - 3H -Androstenedione as a substrate according to source of tissue and preparation mode.

	BRAIN	OVARY	SIG. LEVEL
	n = 3/4 (V_{max}/K_m)	n = 5/4 (V_{max}/K_m)	
HOMOGENATES	$V_{max} = 7.87 \pm 0.1$ pmol/mg prot /h	$V_{max} = 2.14 \pm 0.6$ pmol/mg prot /h	$P < 0.001$
	$K_m = 7.33 \pm 0.6$ nM	$K_m = 4.57 \pm 1.3$ nM	NS
	n = 2/3 (V_{max}/K_m)	n = 3/2 (V_{max}/K_m)	
MICROSOMES	$V_{max} = 13.26 \pm 2.9$ pmol/mg prot /h	$V_{max} = 2.38 \pm 0.4$ pmol/mg prot /h	$P < 0.05$
	$K_m = 4.11 \pm 0.5$ nM	$K_m = 3.40 \pm 0.5$ nM	NS

Data shown as mean \pm SEM. n = number of determinations. NS = not significant.

Thus, the optimized assay conditions were: 10 mg of fresh tissue, a strength of phosphate buffer of 50 mM, a pH of 7.4, 30 min of incubation time, 30°C of incubation temperature, a concentration of substrate (1β - ^3H -androstenedione) of 150 nM, and the following concentrations of the components of the NADPH-generating system: NADP 1 mM, glucose-6-phosphate 10 mM, and glucose-6-phosphate dehydrogenase 2 IU/ml. With these conditions, the assay was sensitive in that it was capable of detecting AA activity as low as <10 fmol/mg protein/hr.

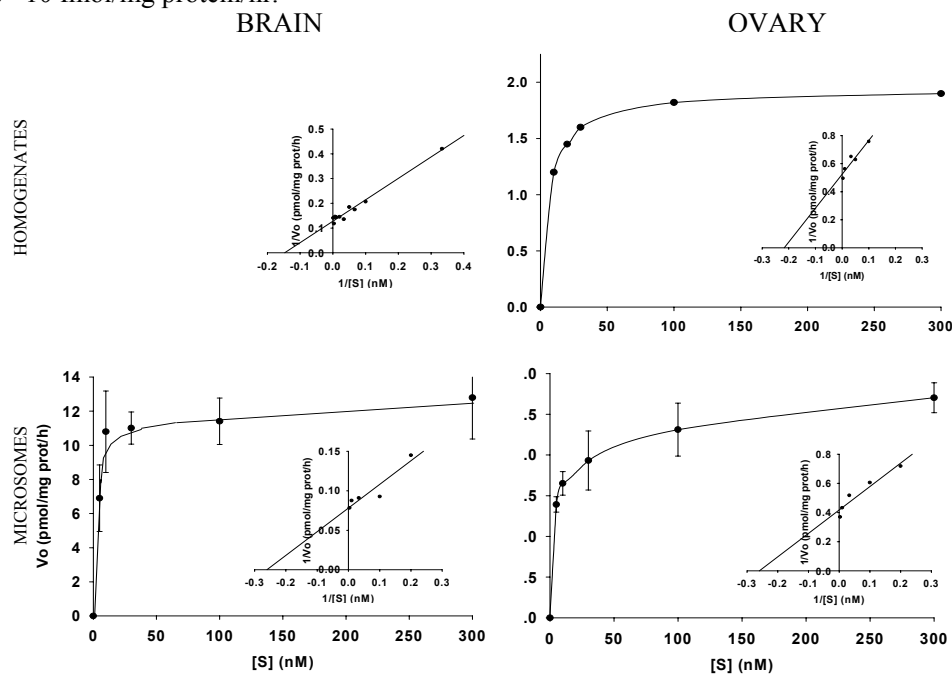


Fig 16. Saturation analysis of aromatase activity in: (A) Brain homogenates; (B) Ovarian homogenates; (C) Brain microsomes and (D) Ovarian microsomes. The different tissue preparations (10 mg FW), were incubated 30 min at 30°C, with increasing concentrations of $[1\beta$ - ^3H]-androstenedione (S) from 3-1,000 nM. Inserts: Lineweaver-Burk plots to determine the V_{\max} and K_m in each case.

Application of the aromatase assay

The validated and optimized tritiated water assay was used to determine sea bass aromatase affinity for androstenedione (K_m) and its maximum reaction rate (V_{max}) in both brain and ovarian homogenates. Significant differences in V_{max} were found between the two organs regardless of whether crude homogenates ($P < 0.001$) or purified microsomes ($P < 0.05$) were used (Table 1). However, differences in K_m were not statistically significant, although the brain had higher values than the ovary in both types of preparation, denoting a slightly lower affinity for androstenedione of the brain aromatase when compared with the ovarian aromatase. This is reflected in different slopes in the Lineweaver-Burk inverse plots shown in the inserts of Fig. 16.

Discussion

This paper reports the optimization and validation of the tritiated water release assay to measure AA in the sea bass. This assay has been used to measure AA under a variety of experimental paradigms in other species of teleosts, such as, Atlantic salmon, *Salmo salar* (Mayer et al., '91) and Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Chang et al, '97), but in none of them has the method been validated taking into consideration all the variables included in our study. Here, it is interesting to note that small changes in some assay variables resulted in significant changes of measured AA. In this regard, AA both in brain and in ovary was directly proportional to the temperature of incubation in the range 10-30°C, which coincides with the range of temperatures in which sea bass can live (Pickett and Pawson, '94). Aromatase activity has been shown to be a function of temperature in some reptiles such as the turtle, *Emys orbicularis*. The V_{max} values presented in this paper for brain and ovarian homogenates (7.87 ± 0.1 and 2.14 ± 0.6 pmol/mg protein/hr, respectively) obtained with incubations at 30°C therefore represent maximal attainable values that would normally not be reached under conditions occurring in nature. It has been shown that in the sea bass, temperature affects both sex differentiation (Blázquez et

al., '98; Pavlidis et al., 2000) and the onset of first maturity (Pawson et al., 2000). These processes occur during winter with water temperatures around 15°C. Hence, based on the linear effect of temperature on sea bass ovarian AA, values of V_{\max} in the order of fmol-pmol/mg protein/hr would be expected for ovarian aromatase in sea bass in water at 15°C. Here, our purpose is simply to suggest that this AA could be sufficient to implicate aromatase in sex differentiation in the sea bass. To illustrate this point, consider that in vitro studies with reptiles or amphibia have shown that values as low as 1 pmol/gonad/hr in *Pleurodeles waltl* (Chardard et al., '95) or even lower, 10-15 fmol/gonad/hr in *Emys orbicularis* (Desvages and Pieau, '92), are sufficient to feminize sexually undifferentiated embryos. Therefore, temperature could affect sex differentiation in the sea bass through its effects on aromatase activity and thus on estrogen synthesis. However, to prove this, actual measurement of estrogen production at different temperatures would be needed, as well as binding of formed estrogen to its receptor.

With the validated tritiated water release assay described above, the kinetic characteristics of sea bass aromatase were calculated. Brain- and ovarian-derived homogenates containing the native enzyme exhibited different catalytic properties. Our results show that the V_{\max} of the brain aromatase is four-fold higher than that of ovarian aromatase, in line with what has been previously reported in goldfish, where the difference is ten-fold (Pasmanik and Callard, '85). Recently, the study of aromatase in goldfish has included the use of transfected COS or CHO cells (Tchoudakova and Callard, '98; Zhao et al., 2001). Experiments using transfected cells have the advantage of allowing the measurement of the intrinsic activity of enzyme isoforms derived from two distinct tissues. However, it is necessary to ensure that expression of the protein in the transfected cells is at comparable levels (Zhao et al. 2001) or that no constitutive pathways interfere with the measurement of AA, as is the case with the 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity of COS cells (Trant, '94). On the other hand, in vitro assays with crude

homogenates containing the native protein like the one described here may more closely resemble the situation in vivo. However, in in vitro assays, measurements of AA in different tissues include effects of possible differences in transcription levels, competing pathways and, in the particular case of the aromatase enzyme complex, changes in the amount of NADPH cytochrome reductase.

This study, therefore, reports the specific measurement of the catalytic properties of brain- and-ovarian derived aromatases in their native form. Furthermore, due to the large size of adult sea bass and thus of their organs, the comparisons were made practically on an individual basis, i.e., typically a pool of 2-3 females was used in each preparation to compare brain vs. ovarian AA. In addition, since AA is sex- and time-dependent (data not shown), the comparison between neural and gonadal aromatase presented here was made using only females obtained between November and February, which includes the prespawning and spawning season of this species in the Mediterranean.

In contrast to the four-fold higher V_{\max} of brain vs ovarian aromatase ($P < 0.001$) mentioned above, the brain K_m (7.33 ± 0.6 nM) and the ovarian K_m (4.57 ± 1.3 nM) were not significantly different, demonstrating that sea bass aromatase has similar affinity for androstenedione in both tissues but higher catalytic activity in the brain. Further proof of this was obtained when comparisons were made using microsomes, i.e., significantly higher V_{\max} in brain than in ovary but similar K_m , although absolute values of V_{\max} and K_m were higher and lower, respectively, than those obtained with crude homogenates, reflecting the higher purification of the enzyme in the microsomal preparations, as expected, since P450 aromatase is associated with the smooth endoplasmic reticulum (Simpson et al., '94). Other previously published K_m values for androstenedione of piscine aromatase are: 5 nM in goldfish brain homogenates (Pasmanik et al. '88), 8.2 nM in goldfish brain microsomes (Zhao et al., 2001), 30 nM in African catfish, *Clarias gariepinus* brain homogenates (Timmers and Lambert, '87) and 435 nM in rainbow trout,

Oncorhynchus mykiss, ovarian microsomes (Shilling, '99). In comparison, our results indicate very high affinity of aromatase for androstenedione in both sea bass brain and ovary. Although androstenedione is a somewhat better substrate than testosterone for both human (Zhou et al., '91) and goldfish aromatase (Zhao et al., 2001), results in the goldfish reveal essentially the same preference for both substrates. Accordingly, we would expect similar results in the sea bass. In any case, the sea bass K_m for brain aromatase reported here (7.33 ± 0.6 nM) is located within the range of concentrations of circulating testosterone (3-30 nM) (Prat et al., '90; Asturiano et al., 2000) observed during the annual reproductive cycle, enabling substrate-dependent changes in AA under conditions in vivo.

In conclusion, we have optimized and validated the tritiated water assay to measure AA in the sea bass. By taking into consideration the peculiarities of this assay discussed above, it can be applied to measure AA in other species. We have shown that AA is affected by temperature in this species where the environmental temperature affects sex ratios, suggesting a possible mechanism for the effects of the environment on sex differentiation. We have also shown that the sea bass aromatase K_m , the first reported for any seawater fish, is among the lowest calculated so far for any fish species and indicates high affinity for androgen. Our results also show that per amount of tissue (protein), the brain has significantly higher aromatase activity than the ovary, which can be due to higher content of aromatase in the brain vs. the ovary or due to the existence of two isoforms, with higher intrinsic catalytic activity of the brain isoform something that, if confirmed, would be consistent with what has been reported in the goldfish (Zhao et al., 2001). Since the goldfish (cyprinid) and the sea bass (Neoteleost; perciform) diverged from one another about 145-200 million years ago during teleost evolution, these differences suggest that this could be the norm in teleosts. However, in the case of the sea bass, it remains to be determined whether two catalytic activities are a reflection of the existence of two isoforms of aromatase. The validated tritiated assay can be useful to study AA in their native form during key developmental processes.

Acknowledgments

Supported by CICYT grant MAR96-1860 and EU grant Q5RS-2000-31365 to F.P. A.G. was supported by a predoctoral fellowship from the Ministry of Science and Technology (MCyT) from Spain.

Literature cited

Ackerman GE, Smith ME, Mendelson CR, McDonald P, Simpson E. 1981. Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. Clin. Endocrinol. Metabol. 53: 412-417.

Antonopoulou E, Mayer I, Berglund I, Borg B. 1995. Effects of aromatase inhibitors on sexual maturation in Atlantic salmon, *Salmo salar*, male parr. Fish Physiol. Biochem. 14: 15-24.

Asturiano JF, Sorbera LA, Ramos J, Kime DE, Carrillo M, Zanuy S. 2000. Hormonal regulation of the European sea bass reproductive cycle: an individualized female approach. J. Fish Biol. 56: 1155-1172.

Baroiller JF, Chourrout D, Fostier A, Jalabert B. 1995. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. J. Exp. Zool. 273: 216-233.

Blázquez M, Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, Donaldson EM. 1995. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 α -methyltestosterone prior to sex differentiation. Aquaculture 135: 329-342.

Blázquez M, Zanuy S, Carrillo M, Piferrer F. 1998. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). J. Exp. Zool. 281: 207-216.

Callard GV, Drygas M, Gelinas D. 1993. Molecular and cellular physiology of aromatase in the brain and retina. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 44: 541-547.

Callard GV, Petro Z, Ryan KJ. 1981. Biochemical evidence for aromatization of androgen to estrogen in the pituitary. Gen. Comp. Endocrinol. 44: 359-364.

Callard GV, Petro Z, Ryan KJ. 1977. Conversion of androgen to estrogen and other steroids in the vertebrate brain. Am. Zool. 18: 511-523.

Chang XT, Kobayashi T, Kajiura H, Nakamura M, Nagahama Y. 1997. Isolation and characterization of the cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis. J. Mol. Endocrinol. 18: 57-66.

Chardard D, Desvages G, Pieau C, Dourmon C. 1995. Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. Gen. Comp. Endocrinol. 99: 100-107.

Cruz M, Canario AVM. 2000. cDNA cloning and expression of brain and ovary aromatase in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. In: Reproductive Physiology of Fish, vol.6. (B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson and S.O. Stefansson, eds.) Pub. Univ. Bergen, Bergen p.193. ISBN: 82-7461-048-2.

D'Cotta H, Fostier A, Guiguen Y, Govoroun M, Baroiller JF. 2001. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia

Oreochromis niloticus. Mol. Reprod. Dev. 59: 265-276.

Desvages G, Pieau C. 1992. Time required for temperature-induced changes in gonadal aromatase activity and related gonadal structure in turtle embryos. Differentiation 52: 13-18.

González A, Piferrer F. 2000. Cytochrome P450 aromatase enzyme activity and reproduction in teleost fish: Studies in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: Reproductive Physiology of Fish, vol.6. (B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson and S.O. Stefansson, eds.) Pub. Univ. Bergen, Bergen pp.39-42. ISBN: 82-7461-048-2.

Guiguen Y, Baroiller JF, Ricordel MJ, Iseki K, McMeel OM, Martin SA, 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.

Hutchison JB, Schumacher M, Steimer Th, Gahr M. 1990. Are separable aromatase systems involved in hormonal regulation of the male brain? J. Neurobiol. 21: 743-759.

Jeyasuria P, Place AR. 1998. Embryonic brain-gonadal axis in temperature-dependent sex determination of reptiles: a role for P450 aromatase (CYP19). J. Exp. Zool. 281: 428-449.

Kishida M, Callard GV. 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. Endocrinology 142: 740-750.

Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, Abe SI. 2000. Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Mol. Reprod. Dev. 56: 1-5.

Kwon JY, Haghpanah V, Kogson-Hurtado LM, McAndrew BJ, Penman DJ. 2000. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. J. Exp. Zool. 287: 46-53.

Kwon JY, McAndrew BJ, Penman DJ. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Mol. Reprod. Dev. 59: 359-370.

Lephart ED, Simpson ER. 1991. Assay of aromatase activity. In: Methods in Enzymology, vol. 286. Academic Press, San Diego, pp. 477-483.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein determination with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Mayer I, Borg B, Berglund I, Lambert JGD. 1991. Effects of castration and androgen treatment on aromatase activity in the brain of mature male Atlantic salmon (*Salmo Salar* L.) parr. Gen. Comp. Endocrinol. 82: 86-92.

Nakajin S, Shinoda M, Hall PF. 1986. Purification to homogeneity of aromatase from human placenta. Biochem. Biophys. Res. Comm. 134: 704-710.

Osawa Y, Spaeth DG. 1971. Estrogen biosynthesis. Stereospecific distribution of tritium

in testosterone- $1\alpha,2\alpha$ - t_2 . *Biochemistry*. 10: 66-71.

Pasmanik M, Callard GV. 1985. Aromatase and 5 α -reductase in the teleost brain, spinal, cord, and pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60: 244-251.

Pasmanik M, Schlinger BA, Callard GV. 1988. In vivo steroid regulation of aromatase and 5 α -reductase activities in brain and pituitary of goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 175-182.

Pavlidis M, Koumoundouros G, Sterioti A, Somarakis S, Divanach P, Kentouri M. 2000. Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Exp. Zool.* 287: 225-232.

Pawson MG, Pickett GD, Witthames PR. 2000. The influence of temperature on the onset of first maturity in sea bass. *J. Fish Biol.* 56: 319-327.

Pickett GD, Pawson MG. 1994. *Sea bass. Biology, exploitation and conservation.* Chapman and Hall. London. 337pp.

Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, Solar I, Devlin R, Donaldson E. 1994. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *J. Exp. Zool.* 270: 255-262.

Prat F, Zanuy S, Carrillo M, Mones A, Fostier A. 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78: 361-373.

Prefontaine M, Shih C, Pan CC, Bhavnani BR. 1990. Applicability of product isolation and the radiometric aromatase assays for the measurement of low levels of aromatase: lack of aromatase activity in the human endometrium. *Endocrinology* 127: 539-551.

Roblin C, Bruslé J. 1983. Ontogenèse gonadique et différenciation sexuelle du loup *Dicentrarchus labrax*, en conditions d'élevage. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 23: 115-127.

Rodríguez L, Carrillo M, Sorbera LA, Soubrier MA, Mañanós E, Holland MC, Zohar Y, Zanuy S. 2000. Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120: 67-74.

Shilling AD, Carlson DB, Williams DE. 1999. Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, as a model for aromatase inhibition. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 70: 89-95.

Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarnah B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Bendelson CR, Bulun SE. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* 15: 342-355.

Sokal RR, Rohlf FJ. 1981. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research* (2ª Ed.) New York, W.H. Freeman y Co. 859 pp.

Tchoudakova A, Callard GV. 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology* 139: 2179-2189.

Thompson EA Jr., Siiteri PK. 1974. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J. Biol. Chem.* 249: 5364-5372.

Timmers RJM, Lambert JGD. 1987. Measurement of aromatase activity in the brain of the African catfish, *Clarias gariepinus*, a comparison of two assay methods. *Comp. Biochem. Physiol.* 88: 453-453.

Timmers RJM, Lambert JGD, Peute J, Vullings HGB, van Oordt PGWJ. 1987. Localization of aromatase in the brain of the male African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by microdissection and biochemical identification. *Comp. Neurol.* 258: 368-377.

Trant JM. 1994. Isolation and characterization of the cDNA encoding the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) form of cytochrome P450arom. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95: 155-168.

Zhao J, Mak P, Tchoudakova A, Callard G, Chen S. 2001. Different catalytic properties and inhibitor responses of the goldfish brain and ovary aromatase isozymes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 123: 180-191.

Zhou DJ, Pompon D, Chen SA. 1991. Structure-function studies of human aromatase by site-directed mutagenesis: kinetic properties of mutants Pro-308 to Phe, Tyr-361 to Phe, Tyr-361 to Leu, and Phe-406 to Arg. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88: 410-414.

CAPÍTULO III

AROMATASE ACTIVITY IN THE EUROPEAN SEA BASS (*Dicentrarchus labrax* L.) BRAIN. DISTRIBUTION AND CHANGES IN RELATION TO AGE, SEX, AND THE ANNUAL REPRODUCTIVE CYCLE

González, A., and Piferrer, F. (2003). Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. Gen. Comp. Endocrinol. (In press).

Abstract

Cytochrome P450 aromatase activity (AA) was measured in different tissues of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) using a tritiated water release assay that was previously optimized and validated for this species. In adult fish entering the reproductive season, most AA was localized in the brain (2.04 ± 0.4 pmol/mg prot/h; mean \pm SEM), followed by the ovary (0.59 ± 0.1) and was detectable in visceral fat (0.21 ± 0.05), liver (0.08 ± 0.009), and head kidney (0.03 ± 0.004). However, AA was negligible in the rest of the tissues tested: heart, testis, muscle, and spleen. Consistent with results obtained in other species, dissection of the brain into its major constitutive parts revealed that AA was concentrated in areas implicated in the control of reproduction, including the olfactory bulb, telencephalon, and hypothalamus (range: 2.6-16.2 pmol/mg prot/h), as well as the pituitary gland (6.2-9.3 pmol/mg prot/h). Lower AA was noted in the optic bulb, cerebellum, and medulla. However, in contrast to some previously published reports concerning the content and distribution of neural aromatase in fish, males consistently exhibited higher AA than females. In one-year-old juvenile fish completing the process of gonadal sex differentiation, brain AA (0.63 pmol/mg prot/h) was similar in both sexes and ten times lower than that measured in the brain of first time spawners (6.52 pmol/mg prot/h), in this case with males showing an overall higher (24%) activity than females. When surveyed throughout the year, brain AA dramatically changed during the reproductive cycle. Maximum average values of ~ 7 pmol/mg prot/h were obtained that coincided with the spawning season. The peak in brain AA was preceded by two and one months by the peak of plasma testosterone and the peak of the gonadosomatic index, respectively. This is the first measurement of the distribution of the activity of a steroidogenic enzyme in the sea bass, an established model in comparative endocrinology. Together, these results demonstrate sex- and seasonally-related variations in AA and establish the basis for further comparative studies of certain androgen-mediated actions through locally formed estrogen in both central and peripheral targets.

Introduction

Aromatase activity (AA) is present in all vertebrates and, based on studies carried out mostly in mammals, has been demonstrated in several tissues and organs: gonad, brain, placenta, liver, kidney, digestive tract, and adipose tissue (Simpson *et al.*, 1994). In several species of birds, AA was found in brain and liver but not in testis, muscle and adrenal gland (Silverin *et al.*, 2000). In the turtle *Chrysemys picta*, AA was maximum in brain, detectable in the gonads but negative in muscle, liver, and adipose tissue (Callard *et al.*, 1977). In fish, data on the tissue distribution of aromatase are very scarce and limited to just two species. In the longhorn sculpin, *Myoxocephalus octodecemspinosus*, the brain and ovary exhibited high AA but other tissues tested, including liver, kidney, heart, muscle, skin, and gills, were negative (Callard *et al.*, 1981). In the goldfish, *Carassius auratus*, brain AA per unit protein was ten times higher than in the ovary and a hundred times higher than in the mammalian ovary (Callard *et al.*, 1978a; Pasmanik and Callard, 1988a). Higher brain than ovarian AA was also evidenced in our previous study with the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (González and Piferrer, 2002). Thus, although it is clear that the teleost brain has a constitutive, exceptionally high AA, the overall distribution of AA in different tissues is not well known in fish and deserves further study.

Within the fish brain, biochemical and microanatomical studies have shown that high AA is consistently detected in regions implicated in the control of reproduction in all species tested (Callard *et al.*, 1981; Pasmanik and Callard, 1985; Borg *et al.*, 1987; Timmers *et al.*, 1987; Andersson *et al.*, 1988; Callard *et al.*, 1988; Mayer *et al.*, 1991). However, the role of the locally-formed neuroestrogen is still a matter of debate (Callard *et al.*, 2001). Furthermore, data on brain AA in relation to development or during the annual reproductive cycle are very scarce in fish. In two species of perch (*Perca fluviatilis* and *Rutilus rutilus*), Noaksson *et al.* (2001) reported that brain AA in sexually immature females was significantly lower (~0.5 pmol/mg prot/h) than that measured in sexually

mature females (1.7-2.5 pmol/mg prot/h). In the goldfish brain, AA and androgen receptor (AR) abundance peaked at the same time, coinciding with the spawning season, whereas low AA and AR abundance corresponded to reproductive inactivity (Callard *et al.*, 1993)

The sea bass is an important perciform gonochoristic species for basic and applied research in which there are a quite number of studies available on several aspects of its endocrinology. Studies in the brain of the sea bass include the distribution of salmon gonadotrophin releasing hormone (sGnRH) (Kah *et al.*, 1991), the expression of three forms of GnRH (González-Martínez *et al.*, 2001), the content of sGnRH and other forms in brain and pituitary (Kah *et al.*, 1994; Zanuy *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2000a), the distribution of neurotransmitters (Batten *et al.*, 1993), and the expression of NPY (Cerdá-Reverter *et al.*, 2000). However, in the sea bass, although different AA in brain vs ovarian homogenates has been demonstrated (González and Piferrer, 2002), suggesting the existence of two isoforms as seems to be the norm in teleosts (Kishida and Callard, 2001; Kwon *et al.*, 2001), there are no data on the distribution of any steroidogenic enzyme in the brain. Recently, the sea bass ovarian aromatase was cloned (Dalla Valle *et al.*, 2002). This research was undertaken with the objective of contributing to the study of the overall distribution of AA in fish using the sea bass as a model. We focused on the distribution of AA in specific brain areas. Changes in brain AA in relation to age, sex and during a full annual reproductive cycle were also investigated and are reported.

Materials and methods

Fish

Adult sea bass (*Dicentrarchus labrax*), ranging from 200 to 700 g body weight (BW), were obtained from commercial fish farms along the Catalan coast (NE of Spain), where they had been maintained in floating net pens under natural conditions of temperature and

photoperiod and fed with pelleted food. Fish were first numbed in ice-chilled seawater and then weighed and measured. Blood was extracted from the caudal vein, placed in heparinized tubes and centrifuged at 3,500 rpm for 20 min at 4°C. The plasma was stored at -20°C until analysis. Fish were sacrificed by decapitation and tissues were dissected and transported to the laboratory in tubes on crushed ice where they were used immediately or stored at -80°C until analysis. The gonadosomatic index (GSI) was calculated as (gonad weight /BW) x 100. Further dissection of the brain was performed based on the information provided in Cerdá-Reverter *et al.* (2001a, b).

Radioisotopes and Reagents

The labeled hormone used as a substrate for the aromatase assay, [1 β -³H]-androstenedione (Sp. Act. 23.1-28.5 Ci/mmol; New England Nuclear [NEN] Boston, MA), was purified before use by thin layer chromatography on silica gel plates (Merck Farma y Química, S.A., Barcelona, Spain) using twice ether-hexane (3:1, v/v). Authentic tritiated water (³H₂O) used to calculate recoveries was acquired from NEN. Inert steroids and reagents were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Organic solvents were of analytical grade and were supplied by Merck Farma y Química, S.A.

Aromatase assay

The tritiated water release assay was used to measure AA. This assay had been previously optimized and validated in the sea bass and is described in detail elsewhere (González and Piferrer, 2002). Briefly, a NADPH-generating system consisting of 1 mM NADP, 10 mM glucose-6-phosphate, and 2 IU/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase plus [1 β -³H]-androstenedione at 150 nM were preincubated at 37°C. After 30 min, 10 mg (fresh weight) of tissue homogenate (50 mM phosphate buffer, 1:10; w:v) were added and incubated with gentle shaking for 30 min at 30°C. The reaction was stopped by placing tubes on crushed ice and adding trichloroacetic acid. Samples were then centrifuged and

the supernatant extracted with chloroform. The aqueous phase was washed with dextran-activated charcoal (DCC), centrifuged, and an aliquot of the supernatant was counted in a liquid scintillation counter. The micro-Lowry method was used for determining protein concentration after solubilizing the pellet with NaOH (Lowry *et al.*, 1951). The tritiated water assay allows measurement of AA levels < 10 fmol/mg prot/h in the sea bass, with an intra-assay error of 7.3% and an inter-assay error of 8.7% (González and Piferrer, 2002).

Plasma levels of sex steroids

Plasma levels of testosterone (T) and estradiol (E₂) were measured by radioimmunoassay (RIA). Plasma was extracted three times with methanol (1:5; v/v). The extracts were collected and evaporated, and the dry pellet resuspended in RIA buffer (10 mM phosphate buffer, 150 mM saline, 0.1% gelatin, pH 7.4). Percent recovery was calculated in parallel samples spiked with 10,000 cpm radiolabeled steroid and was usually about 90%. Samples were incubated overnight at 4°C in the presence of a specific antiserum at a dilution 1:50,000 (T) or 1:40,000 (E₂). The T antiserum was donated by Dr. S. Zanuy (Castellón, Spain) and it has been previously validated (Rodríguez *et al.*, 2000b), whereas the E₂ antiserum was obtained and validated as described below. Free steroids were eliminated by washing with DCC, and the radioactivity in an aliquot of the supernatant containing the bound steroid was measured with a liquid scintillation counter.

The E₂ antiserum was generated by injecting three rabbits with β -estradiol 6-(O-carboxymethyl)oxime:BSA and Freund's Adjuvant in saline buffer (9%). The antibody titer was monitored after taking a blood samples at periodic intervals. After 90 days, the rabbits were bled completely and the serum was obtained after clotting and spinning the blood. Cross reactions of the obtained E₂ antiserum with other steroids were as follows: estrone, 0.87%; 17 α -estradiol, 0.23%; estriol, 0.21%; and $< 0.1\%$ for the rest of the

steroids checked: 17 α -hydroxyprogesterone, 11-ketotestosterone, testosterone, and 4-pregnen-17,20 β -diol-3-one.

Data analysis

Aromatase activity is expressed as the reaction velocity, V_0 , of the conversion of androstenedione to tritiated water, using pmol/mg protein/h as the units (González and Piferrer, 2002). In the graphs, AA is depicted as mean \pm standard error of the mean (SEM) representing three or four replicates for each treatment within a given experiment. Every experiment was repeated at least two times, or else key treatments were replicated in subsequent experiments. Analysis of variance (ANOVA) or Student's t-test was used to analyze differences between treatments (Sokal and Rohlf, 1981). The Duncan's Multiple Range test was used for post-ANOVA comparison of means. Differences were accepted as significant when $P < 0.05$.

Results

Tissue distribution

To investigate the overall distribution of AA in the sea bass, several tissues, representative of different embryonic origins, were homogenized and assayed. These included the whole brain and portions of the male liver, heart, visceral fat, head kidney, spleen, testis, muscle, and female ovary. Tissues were obtained from adult fish of 400-500 g BW sampled in November-January, i.e., entering the reproductive season. After dissection, the homogenization and incubation conditions were the same for all tissues. Results (Fig. 17) showed that AA per milligram of protein was detected, from higher to lower amounts, in the brain, ovary, visceral fat, liver, and head kidney. In the latter tissue, AA was 28 fmol/mg prot/h, a value 3-fold higher than the background control. In the rest of organs considered, including the testis, AA was negligible. When compared together, ANOVA showed that there were significant differences ($P < 0.01$) between the brain and

all the remaining tissues. However, pairwise comparisons, tissue by tissue, against appropriate control background confirmed significant ($P < 0.05$) positive AA not only in the brain and ovary but also in the visceral fat, liver, and head kidney.

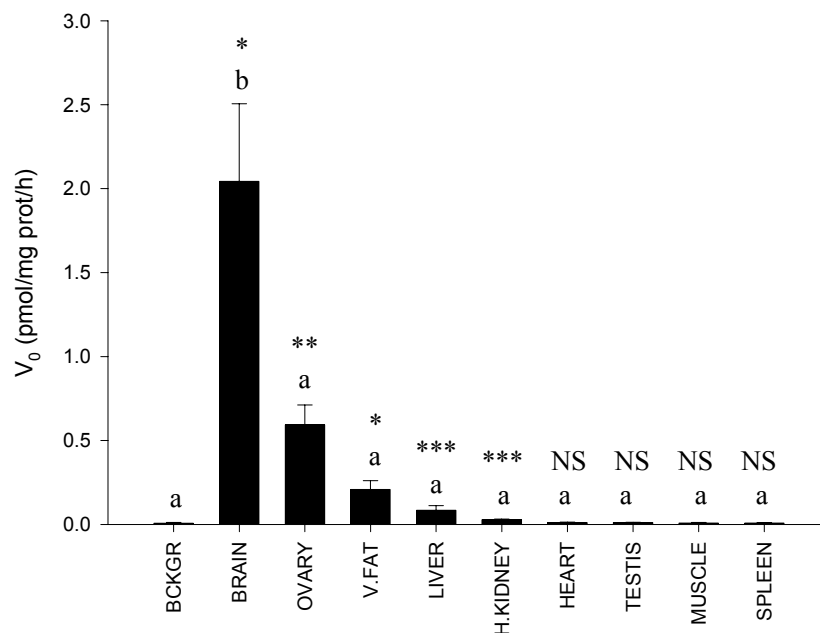


Fig. 17. Tissue distribution of aromatase activity in the sea bass. Tissues were obtained from adult fish sampled in November-January. Abbreviations: BCKGR = Background (obtained by incubating the substrate without tissue); V.FAT. = Visceral fat; H.KIDNEY = Head kidney. Depending on the tissue, pools of 1-4 fish were used in each experiment. Data as mean + SEM of three separate experiments. Different letters indicate significant differences ($P < 0.01$) with respect to other treatments when all tissues were compared together. Significant differences in the pairwise comparisons (Student's *t* test), tissue by tissue, against appropriate control background are labeled with asterisks (* = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; NS = Not significant).

Distribution in the different brain areas

As shown in Fig. 17, the brain exhibited the highest aromatase activity of all tissues tested. This was consistent with our previous observations in the sea bass (González and

Piferrer, 2002), as well as with a reported generalized high AA in the teleost brain. As a further step in the investigation of the distribution and function of AA within the sea bass, brains were obtained from adult male and female fish in February, at the peak of the reproductive season, and further dissected into their major constitutive parts. It was found that AA was highest in, but not limited to, the anterior brain: olfactory bulb, telencephalon, and hypothalamus, as well as in the pituitary. Lower levels were detected in the mid and posterior brain, particularly in the cerebellum and the medulla (Fig. 18).

Fig. 18. Distribution of aromatase activity in the different constitutive parts of the sea bass brain: olfactory bulb (OLB), telencephalon (TEL), hypothalamus (HYP), optic bulb (OPB), cerebellum (CER), medulla (MED), and in the pituitary gland (PIT). Brains were obtained from adult animals in February (reproductive season). Data as mean + SEM of a representative experiment with three males and four females, with quadruplicate determinations for each fish. Differences between sexes: * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$, NS = not significant.

Furthermore, and regardless of the region considered, higher AA was consistently observed in males (average ~60% higher activity) than in females, with significant differences in the following areas: telencephalon ($P < 0.001$), hypothalamus ($P < 0.01$), pituitary gland, and optic bulb ($P < 0.05$). Although the olfactory bulb of males had 31% more AA than that of females, statistically no differences were found between the two sexes in this area, this probably being due to the variation in AA observed in males.

AGE

Fig. 19. Changes of brain aromatase activity with age in the sea bass. Activity was tested in one-year-old juvenile fish, completing the process of gonadal sex differentiation and in adult fish that were first time spawners, sampled at the peak of the reproductive season. Data as mean + SEM of three separate experiments.

Changes with age

Next, possible age-dependent changes in brain AA were determined using as reference points two well established events known to be relevant for reproduction: sex differentiation and first maturity.

For this purpose, AA was measured in the brain of one-year-old juveniles, an age at which the process of sex differentiation is being completed in this species, thus allowing for the discrimination of gender (Blázquez *et al.*, 1995), and compared with brain AA of first-time spawners that were at the peak of the reproductive season at the beginning of February. In both cases, fish were analyzed after being separated according to sex. The results revealed that AA was already evident in juvenile fish, with values of 0.63 pmol/mg prot/h (Fig. 19). Overall, AA in adults was 10 fold higher than in juveniles ($P < 0.05$). In both cases, no significant differences were detected between sexes, although adult males exhibited 24% higher AA than females, an observation consistent with previous results obtained in specific brain areas.

Changes with the annual reproductive cycle

To study changes in brain AA during the annual reproductive cycle, adult sea bass were sampled throughout one full year, and brain AA was measured, mostly in males (males account for 70-95% of cultured sea bass and thus are the most readily obtained sex from fish farms).

Brain AA dramatically changed throughout the year, with minimum values of ~0.2 pmol/mg prot/h detected at the end of the summer, and maximum values of ~7 pmol/mg prot/h observed in February, coinciding with the peak of the spawning season in the Mediterranean (December to March) (Fig. 20). A second, lower peak was detected in April, when GSI values and T plasma levels had returned essentially to basal levels. Plasma T peaked in December and the GSI was maximum in January, i.e., one and two

months, respectively, before the peak of brain aromatase. The highest levels of plasma E_2 were also found in December, although particularly during the spawning season were low compared with those of T and, further, did not exhibit clear changes during the whole year. This probably reflects the fact that, as mentioned above, most of the sampled fish were males. Thus, peak brain AA was shifted by about two months with regard to peak levels of plasma T.

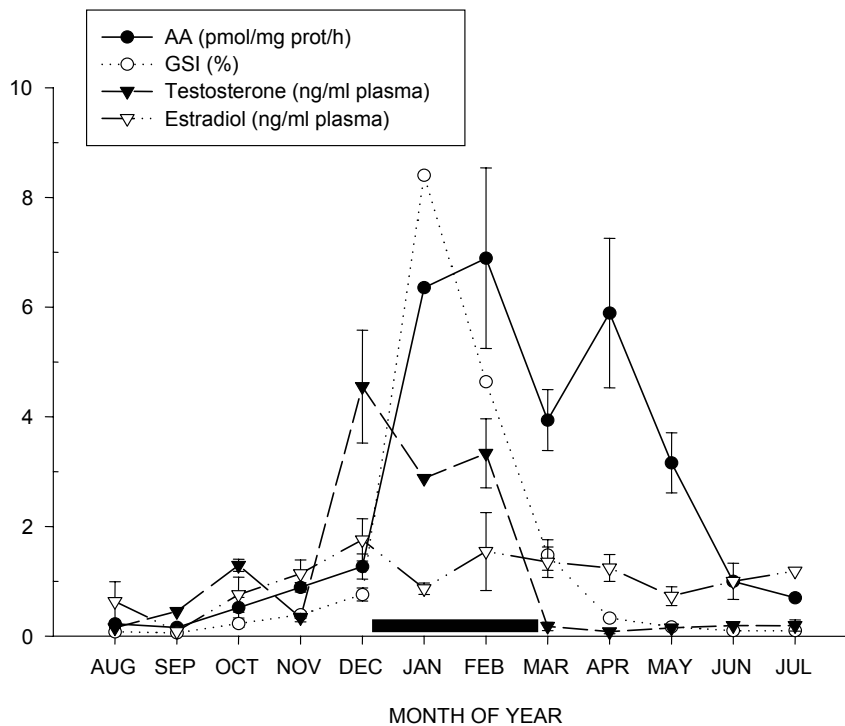


Fig. 20. Changes of brain aromatase activity (AA) in the sea bass during a full annual cycle. Changes in AA (pmol/mg prot/h) (N = 1-9) are illustrated in relation to changes in the gonadosomatic index (GSI) (N = 1-24) to relate brain AA with reproduction and sex steroids levels of testosterone (T) (N = 3-22) or estradiol (E_2) (N = 3-22) (both in ng/ml plasma). The horizontal black bar indicates the extent of the spawning season for this species in the Mediterranean. Data as mean \pm SEM. Errors that are essentially equal or smaller than the size of datapoints are not shown.

Discussion

Consistent with previous results (González and Piferrer, 2002) and with the general pattern described in teleosts, the sea bass showed significantly higher AA in the brain than in the ovary. The significance of this phenomenon in teleosts will not be discussed here, since recently plausible explanations have already been provided in relation to the neuroplasticity of the teleost brain (Callard *et al.*, 2001). Instead, based on our results, we will first focus on the possible significance of AA in fish tissues other than the brain and the gonads, and then on the distribution and changes in brain AA in relation to age, sex, and the reproductive cycle.

Regarding the presence of AA in the visceral fat, to the best of our knowledge, the only available studies for comparison so far were those of Callard *et al.* (1977), carried out in turtle, and Callard *et al.*, (1978b) in the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in which AA was not found in this tissue. In contrast to the above mentioned studies where animals used were wild and thus most likely had a very low amount of visceral fat, in our study with the sea bass, fish were obtained from a commercial farm, where they are fed to satiation with feed of a high fat content. This practice results in the accumulation of a great amount of visceral fat that is readily visible upon dissection. In mammals, where the distribution of aromatase has been extensively examined, increased AA was correlated with an increase in adipose tissue content (Cohen, 2001). Also in mammals, it has been shown that locally-formed estrogen has an important role in maintaining the homeostasis of lipids in both sexes (Jones *et al.*, 2000). This locally-formed estrogen by aromatase in adipose stromal cells would have a paracrine action on the adjacent adipocytes where estrogen receptor (ER) abundance is high (Price and O'Brien, 1993). Our results, therefore, suggest that, provided the right metabolic conditions are present, i.e., the possibility of accumulating a sufficient amount of visceral fat, for example, due to the availability of excess food as in our case, the adipose tissue of fish has, in principle, the potential of local estrogen

synthesis through AA, thus resembling the situation in mammals. If this is confirmed and, given the appropriate conditions, extended to situations occurring in the wild, it would signify that, at least, this function of aromatase in the adipose tissue has been conserved throughout vertebrate evolution.

In the very few previous studies carried out with teleosts, the liver was found to be negative for AA and expression (Callard *et al.*, 1981; Kwon *et al.*, 2001). In contrast, the presence of hepatic aromatase is well documented in mammals and has been found in both mature (González, 1992) and immature rats (Katagiri *et al.*, 1998). The liver is known for its high abundance of P450 enzymes in all vertebrates, but the precise function of aromatase in this organ in egg-laying vertebrates which is an established target for estrogen action, is not clear. In this regard, in *Rana esculenta*, hepatic aromatase was related to the conversion of circulating T into E₂, and suggested to act as a possible complement to ovarian-secreted E₂ in inducing hepatic vitellogenin synthesis (Assisi *et al.*, 2000). A similar situation could be operating in the sea bass and thus explain the presence of AA observed in its liver. In fact, the fish used in our experiment were obtained between November and January, a period when vitellogenin synthesis is maximum in this species (Mañanós *et al.*, 1997), which could also explain the presence of hepatic E₂ formation acting as a complement to ovarian estrogen in the stimulation of vitellogenin synthesis.

The positive AA observed in the head kidney is consistent with the steroidogenic capacity of this organ in fish (Borg, 1994). Similarly, the negative AA observed in the testis is consistent with male teleost having low or negligible levels of plasma estradiol (Borg, 1994), and with previous findings regarding aromatase mRNA expression (Kwon *et al.*, 2001). However, locally-synthesized estrogens in the testes of lower vertebrates has been implicated, as is the case of mammals, in the autocrine or paracrine regulation of certain stages of spermatogenesis (Callard, 1992).

This, therefore, is, to the best of our knowledge, the first study to report AA in the visceral fat, liver, and head kidney of fish, a finding made possible thanks most probably to the fact that it was carried out during the reproductive season when plasma sex steroid hormones (Prat *et al.*, 1990; also this study) as well as AA (this study) reach annual maximum levels in the sea bass. Similarly, for the same reason, it seems safe to assume that the tissues found to be negative for AA in this study would be negative if surveyed at other times during the reproductive cycle. Of the three novel tissues positive for aromatase, the one with the lowest level of AA was the head kidney, which was 28 fmol/mg prot/h, a value significantly different from the background level, and represents a ~3-fold higher value than the sensitivity level (< 10 fmol/mg prot/h) of our validated tritiated water release assay (González and Piferrer, 2002). However, confirmation of the presence of AA in these three tissues would require either the tedious process of recrystallization to constant specific activity of the formed steroid to confirm authentic estrogen production or, better still, the detection of aromatase mRNA. The latter is at present hampered by the fact that so far only the ovarian isoform of aromatase has been cloned in the sea bass (Dalla Valle *et al.*, 2002) and that there are not enough data to suggest what would be the preferred expressed isoform in the liver of this species.

The distribution of AA in the vertebrate brain seems to be conserved among the major groups of species, where it is concentrated in the anterior part, which is related to the control of the reproduction and sexual behavior (Balthazart and Ball, 1998). Our results agree with this overall view and with previously published literature concerning teleosts in which the distribution of AA was concentrated, but not limited to, the areas implicated in the control of reproduction, including the pituitary (Callard *et al.*, 1981; Pasmanik and Callard, 1985; Borg *et al.*, 1987; Timmers *et al.*, 1987; Melo and Ramsdell, 2001). The AA in sea bass brain was higher in males than females, as is the case in quail pituitary (Schlinger and Callard, 1987) and in hypothalamic neurons of mammals (Negri-Cesi *et al.*, 2001), but the opposite of what was found in tilapia nilotica fry, where AA was

measured in whole heads (D'Cotta *et al.*, 2001), or in the longhorn sculpin pituitary (Olivereau and Callard 1985). Presumed high T plasma levels (which would provide the substrate) cannot necessarily explain the higher AA in males because it was previously shown that sea bass females had plasma T levels higher than males (Prat *et al.*, 1990). Another possibility is that females had lower AA than males because the adult fish used were of 2 years of age and sea bass males attain full reproductive capacity at this age whereas females take one year longer. Thus, it would be interesting to examine whether the same results are obtained with older fish.

The amount of AA in the sea bass pituitary gland was of the same magnitude as in the telencephalon, but essentially double that of hypothalamic AA in contrast to findings in tilapia mossambica, *Oreochromis mossambicus*, where the highest levels of AA in the pituitary (detected in the proximal pars distalis) were similar to those in the hypothalamus-preoptic area (Callard *et al.*, 1988). Here it is interesting to note that the distribution of AA in the sea bass brain closely matches the areas where three GnRH forms were detected in the same species by in situ hybridization: olfactory bulb, telencephalon and preoptic area (González-Martínez *et al.* 2001), although the functional significance of this colocalization is not known yet. In this regard, in birds, coexpression of ER and androgen receptor (AR) with AA has been observed in the same areas of the brain, suggesting the possibility of steroid-dependent regulation of AA and indicating a role for aromatase in controlling AR- and ER-dependent processes (Metzdorf *et al.*, 1999). In the musk shrew brain, *Suncus murinus*, there is extensive colocalization of AR and aromatase in specific brain regions, indicating that in both sexes AR may act as a transcription factor to regulate aromatase (Veney and Rissman, 2000). However, in the rainbow trout brain, ER and GnRH-positive neurons did not colocalize (Navas *et al.*, 1995).

Since this work was initiated, information on the cytoarchitecture of the sea bass telencephalon and diencephalon has become available (Cerdá-Reverter *et al.*, 2001a,b). This, together with the information presented here, will facilitate further research on the precise localization of neuroendocrine regions positive for AA as well as for AR and ER, i.e., of sites of active neural sex steroid synthesis and action.

Regarding changes with age, brain AA was detected in one year-old juvenile fish completing sex differentiation with no overall differences between sexes, which is opposed to the situation in differentiating gonads of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, with higher ovarian AA in females than males (Kwon *et al.*, 2001). The possible role, if any, of brain AA in gonadal sex differentiation in fish is far from clear (González and Piferrer, 2000). In contrast, adult sea bass males showed higher activity than females but also without statistical differences between sexes. Here it is interesting to note that despite species differences the observed levels (in pmol/mg prot/h) of AA in immature sea bass (0.63) were quite similar to those reported for immature perch (0.51; Noaksson *et al.*, 2001). However, the AA levels of mature sea bass (6.52) were clearly higher than those of mature perch (1.7-2.5; Noaksson *et al.*, 2001), but the significance of these differences is also not known. In any case, it would be interesting to determine the ontogenesis of AA during the first year of life in the sea bass to find when AA is first detectable and, should differences appear, if these can be ascribed to sex.

Brain AA in the sea bass was maximum coinciding with the spawning season, suggesting the need for increased neural estrogen synthesis during this period. Higher brain AA during the reproductive season is in agreement with previous results obtained in the goldfish (Pasmanik and Callard, 1988b; Callard *et al.*, 1993). Regarding the second peak of AA detected in April, it is interesting to note that this coincides with findings in two independent studies, where a second peak of plasma T (Prat *et al.*, 1990) and of GnRH secretion (Rodríguez, Carrillo, Soubrier, Zohar, Holland, and Zanuy, personal

communication) has been found precisely during this month. We have no explanation for this second peak of AA. Nevertheless, in the sea bass during April there is an overall reorganization of the gonadal tissues after the spawning season which finished one month earlier, and thus it is possible that these phenomena are somehow connected.

Together, these results demonstrate sex- and seasonally-related variations in AA in the sea bass and establish the basis for further comparative studies of certain androgen-mediated actions through locally formed estrogen in both central and peripheral targets.

Acknowledgments

This work was supported by CICYT grant MAR96-1860 and EU grant Q5RS-2000-31365 to F.P. A.G. was supported by a doctoral fellowship from the Ministry of Education and Science, Spain.

References

- Andersson, E., Borg, B., and Lambert, J.G. (1988). Aromatase activity in brain and pituitary of immature and mature Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. Gen. Comp. Endocrinol. 72, 394-401.
- Assisi, L., Di Fiore, M.M., Lamanna, C., and Botte, V. (2000). Relationships between liver testosterone receptor isoforms and aromatase activity in female green frog, *Rana esculenta*. Life Sci. 67, 373-382.
- Balthazart, J., and Ball, G.F. (1998). New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). Trends Neurosci. 21, 243-249.

Batten, T.F., Berry, P.A., Maqbool, A., Moons, L., and 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.

Blázquez, M., Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., and Donaldson, E.M. (1995). Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 α -methyltestosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture.* 135, 329-342.

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

Borg, B., Timmers, R.J., and Lambert, J.G. (1987). Aromatase activity in the brain of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. I. Distribution and effects of season and photoperiod. *Exp. Biol.* 47, 63-68.

Callard, G.V. (1992). Autocrine and paracrine role of steroids during spermatogenesis: studies in *Squalus acanthias* and *Necturus maculosus*. *J. Exp. Zool.* 261, 132-142.

Callard, G.V., Petro, Z., and Ryan, K.J. (1977). Identification of aromatase in the reptilian brain. *Endocrinology* 100, 1214-1218.

Callard, G.V., Petro, Z., and Ryan, K.J. (1978a). Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system. *Endocrinology* 103, 2283-2290.

Callard, G.V., Petro, Z., and Ryan, K.J. (1978b). Androgen metabolism in the brain and non-neural tissues of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 34, 18-25.

Callard, G.V., Petro, Z., Ryan, K.J., and Clairbone, J.B. (1981). Estrogen synthesis in vitro and in vivo in the brain of a marine teleost (*Myoxocephalus*). Gen. Comp. Endocrinol. 43, 243-255.

Callard, G.V., Specker, J.L., Knapp, J., Nishioka, R.S., and Bern, H.A. (1988). Aromatase is concentrated in the proximal pars distalis of tilapia pituitary. Gen. Comp. Endocrinol. 71, 70-79.

Callard, G.V., Drygas, M., and Gelinas, D. (1993). Molecular and cellular physiology of aromatase in the brain and retina. Steroid Biochem. Mol. Biol. 44, 541-547.

Callard, G.V., Tchoudakova, A.V., Kishida, M., and Wood, E. (2001). Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 79, 305-14.

Cerdá-Reverter, J.M., Anglade, I., Martínez-Rodríguez, G., Mazurais, D., Muñoz-Cueto, J.A., Carrillo, M., Kah, O., and Zanuy, S. (2000). Characterization of neuropeptide Y expression in the brain of a perciform fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). J. Chem. Neuroanat. 19, 197-210.

Cerdá-Reverter, J.M., Zanuy, S., and Muñoz-Cueto, J.A. (2001a). Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). I. The telencephalon. J. Morphol. 247, 217-228.

Cerdá-Reverter, J.M., Zanuy, S., and Muñoz-Cueto, J.A. (2001b). Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) II. The Diencephalon. J. Morphol. 247, 229-251.

Cohen, P.G. (2001). Aromatase, adiposity, aging and disease. The hypogonadal-metabolic-atherogenic-disease and aging connection. *Med. Hypotheses*. 56, 702-708.

D'Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M., and Baroiller, J.F. (2001). Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 265-276.

Dalla Valle, L., Lunardi, L., Colombo, L., and Belvedere, P. (2002). European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cytochrome P450_{arom}: cDNA cloning, expression and genomic organization. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80, 25-34.

González, F.J. (1992). Control of constitutively-expressed developmentally-activated rat hepatic cytochrome P450 genes. *Keio J. Med.* 41, 68-75.

González, A., Piferrer, F. (2000). Cytochrome P450 aromatase enzyme activity and reproduction in teleost fish: Studies in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In: *Reproductive Physiology of Fish*, vol.6. (B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson and S.O. Stefansson, eds.) Pub. Univ. Bergen, Bergen pp.39-42. ISBN: 82-7461-048-2.

González, A., and Piferrer, F. (2002). Characterization of aromatase activity in the sea bass. Effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *J. Exp. Zool.* 293, 500-510.

González-Martínez, D., Madigou, T., Zmora, N., Anglade, I., Zanuy, S., Zohar, Y., Elizur, A., Muñoz-Cueto, J.A., and Kah, O. (2001). Differential expression of three different prepro-GnRH (Gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Comp. Neurol.* 429, 144-155.

Jones, M.E., Thorburn, A.W., Britt, K.L., Hewitt, K.N., Wreford, N.G., Proietto, J., Oz, O.K., Leury, B.J., Robertson, K.M., Yao, S., and Simpson, E.R. (2000). Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 12735-12740.

Kah, O., Zanuy, S., Mañanós, E., Anglade, I., and Carrillo, M. (1991). Distribution of salmon gonadotrophin releasing-hormone in the brain and pituitary of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Cell Tissue Res.* 266, 129-136.

Kah, O., Zanuy, S., Pradelles, P., Cerdá, J.L., and Carrillo, M. (1994). An enzyme immunoassay for salmon gonadotropin-releasing hormone and its application to the study of the effects of diet on brain and pituitary GnRH in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 464-474.

Katagiri, M., Tatsuta, K., Imaoka, S., Funae, Y., Honma, K., Matsuo, N., Yokoi, H., Ishimura, K., Ishibashi, F., and Kagawa, N. (1998). Evidence that immature rat liver is capable of participating in steroidogenesis by expressing 17 α -hydroxylase/17,20-lyase P450c17. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 64, 121-128.

Kishida, M., and G.V. Callard. (2001). Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology.* 142, 740-750.

Kwon, J.Y., McAndrew, B.J., and Penman, D.J. (2001). Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 359-370.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein determination with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Mañanós, E.L., Zanuy, S., and Carrillo, M. (1997). Photoperiodic manipulations of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development, and plasma 17 β -estradiol and vitellogenin levels. *Fish Physiol. Biochem.* 16, 211-222.

Mayer, I., Borg, B., Berglund, I., and Lambert, J.G. (1991). Effects of castration and androgen treatment on aromatase activity in the brain of mature male salmon (*Salmo salar* L.) parr. *Gen. Comp. Endocrinol.* 82, 86-92.

Melo, A.C., and Ramsdell, J.S. (2001). Sexual dimorphism of brain aromatase activity in medaka: induction of a female phenotype by estradiol. *Environ. Health Persp.* 109, 257-264.

Metzdorf, R., Gahr, M., and Fusani, L. (1999). Distribution of aromatase, estrogen receptor, and androgen receptor mRNA in the forebrain of songbirds and nonsongbirds. *J. Comp. Neurol.* 407, 115-129.

Navas, J.M., Anglade, I., Bailhache, T., Pakdel, F., Breton, B., Jégo, P., and Kah, O. (1995). Do gonadotrophin-releasing hormone neurons express estrogen receptors in the rainbow trout? A double immunohistochemical study. *J. Comp. Neurol.* 363, 461-474.

Negri-Cesi, P., Colciago, A., Motta, M., Martini, L., Celotti, F. (2001). Aromatase expression and activity in male and female cultured rat hypothalamic neurons: effect of androgens. *Mol. Cell. Endocrinol.* 178:1-10.

Noaksson, E., Tjarnlund, U., Bosveld, A.T., and Balk, L. (2001). Evidence for endocrine disruption in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) in a remote Swedish Lake in the vicinity of a public refuse dump. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 174, 160-176.

Olivereau, M., and Callard, G. (1985). Distribution of cell types and aromatase activity in the sculpin (*Myoxocephalus*) pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 58, 280-290.

Pasmanik, M., and Callard, G.V. (1985). Aromatase and 5 α -reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60, 244-251.

Pasmanik, M., and Callard, G.V. (1988a). A high abundance androgen receptor in goldfish brain: characteristics and seasonal changes. *Endocrinology.* 123, 1162-1171.

Pasmanik, M., and Callard, G.V. (1988b). Changes in brain aromatase and 5 α -reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology.* 122, 1349-1356.

Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M., De Mones, A., and Fostier, A. (1990). Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 78, 361-373.

Price, T.M., and O'Brien, S.N. (1993). Determination of estrogen receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) and cytochrome P450 aromatase mRNA levels in adipocytes and adipose stromal cells by competitive polymerase chain reaction amplification. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 1041-1045.

Rodríguez, L., Carrillo, M., Sorbera, L.A., Soubrier, M.A., Mañanós, E., Holland, M.C., Zohar, Y., and Zanuy, S. (2000a). Pituitary levels of three forms of GnRH in the male

European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. Gen. Comp. Endocrinology. 120, 67-74.

Rodríguez, L., Begtashi, I., Zanuy, S., and Carrillo, M. (2000b). Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: Effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at puberty. Fish Physiol. Biochem. 23, 141-150.

Schlinger, B.A., and Callard, G.V. (1987). A comparison of aromatase, 5 alpha-, and 5 beta-reductase activities in the brain and pituitary of male and female quail (*C. c. japonica*). J. Exp. Zool. 242, 171-180.

Silverin, B., Baillien, M., Foidart, A., and Balthazart, J. (2000). Distribution of aromatase activity in the brain and peripheral tissues of passerine and nonpasserine avian species. Gen. Comp. Endocrinol. 117, 34-53.

Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D., Bendelson, C.R., and Bulun, S.E. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endoc. Rev. 15, 342-355.

Sokal, R.R., and Rohlf, F.J. (1981). Biometry. The principles and practice of statistics in biological research (2^a Ed.) New York. p. 859. W.H. Freeman and Co.

Timmers, R.J.M., Lambert, J.G.D., Peute, J., Vullings, H.G.B., and Van Oordt, P.G.W.J. (1987). Localization of aromatase in the brain of the male African catfish, *Clarias gariiepinus* (Burchell), by microdissection and biochemical identification. Comp. Neurol. 258, 368-377.

Veney, S.L., and Rissman, E.F. (2000). Immunolocalization of androgen receptors and aromatase enzyme in the adult musk shrew brain. *Neuroendocrinology*. 72, 29-36.

Zanuy, S., Carrillo, M., Mateos, M., Trudeau, V., and Kah, O. (1999). Effects of sustained administration of testosterone in pre-pubertal sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*. 177, 21-35.

CAPÍTULO IV

INHIBITION OF SEA BASS BRAIN AND OVARIAN AROMATASE ACTIVITY BY 11 β -HYDROXYANDROSTENEDIONE BUT NOT BY 11 β -HYDROXYTESTOSTERONE

González, A., Piferrer, F. 2002. Inhibition of sea bass brain and ovarian aromatase activity by 11 β -hydroxyandrostenedione but not by 11 β -hydroxytestosterone. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. (En consideración).

|

Abstract

It has been suggested that in teleost fish 11 β -oxygenated androgens rather than testosterone (T) are involved in key developmental events, including gonadal differentiation, a process in which aromatase activity is recognized for playing a central role. Recently, it has also been suggested that the brain may be involved in sex differentiation in fish. Thus, it is possible that locally produced 11-oxygenated androgens may affect the action of neural aromatase. When sea bass brain homogenates were incubated with tritiated androstenedione it was found that the major metabolites produced were, in decreasing order: T, 11-oxygenated androgens, and estrogens, indicating that 11 β -hydroxylase (11 β -H) and aromatase are in fact competing for the same substrate. Further incubations showed that neural aromatase activity was specifically inhibited in a dose-dependent manner by 11 β -hydroxyandrostenedione (11 β OH Δ^4) but not by 11 β OHT. In a standard aromatase assay, Dixon plots revealed that this inhibition was of the linear (total) type and competitive with a $K_i = 36.5 \pm 3.5 \mu\text{M}$, a value one or two orders of magnitude higher than that of the potent aromatase inhibitors 4-OH Δ^4 and Fadrozole. However, when substrate concentrations were reduced one order of magnitude to avoid substrate saturation, the K_i was more appropriately found to be 2.8 μM . 11 β OH Δ^4 was also able to inhibit ovarian aromatase activity ($K_i = 47.3 \pm 4.7 \mu\text{M}$ in a standard aromatase assay). Additional experiments using mitotane, a specific inhibitor of 11 β -H, confirmed that the inhibition of neural aromatase activity by 11 β OH Δ^4 was reversible. Together, these results demonstrate that 11 β OH Δ^4 can inhibit aromatase activity in fish. It remains to be confirmed whether results can be replicated in vivo to confirm 11 β OH Δ^4 as an endogenous inhibitor of aromatase, although preliminary results point towards this direction.

Introduction

It is well established that aromatase, the enzyme which converts androgens into estrogens, is implicated in gonadal sex differentiation in fish. For example, with the administration of estrogens it is possible to feminize a variety of fish species (Piferrer, 2001; Devlin and Nagahama, 2002). In the same way, sexually undifferentiated genotypic females treated with a specific aromatase inhibitor developed as phenotypic males, demonstrating the importance of aromatase in gonadal sex differentiation (*Oncorhynchus tshawytscha*, Piferrer *et al.*, 1994; *O. mykiss*, Guiguen *et al.*, 1999; *Paralychthys olivaceus*, Kitano *et al.*, 2000; *Oreochromis niloticus*, Baroiller *et al.*, 1995; Kwon *et al.*, 2000). Recently it has been shown that in Nile tilapia, a species with both genetic and environmental sex determination, aromatase plays a decisive role in ovarian differentiation while its repression appears to be necessary for male differentiation (Kwon *et al.*, 2001; D’Cotta *et al.*, 2001). Another evidence that aromatase plays a key role in the ovarian differentiation is that the aromatase protein was present during ovarian but not testicular differentiation (Nakamura *et al.*, 1998).

However, the implication of the brain in sex differentiation in fish is still unclear, although there are evidences that treatments with gonadotropin-releasing hormone (GnRH), gonadotropin hormones (GtH) or some neuropeptides (which will stimulate gonadotropin hormone secretion) are able to change the sex of hermaphroditic species (Baroiller *et al.*, 1995). There are also several studies, focused on the involvement of the hypothalamus-pituitary axis via GnRH and GtH, that have demonstrated that this axis is active around or even before the time of sex differentiation (González-Martínez *et al.*, 2001; Baroiller *et al.*, 1995), but further research is needed especially concerning gonochoristic fish. Regarding the question if aromatase is implicated in brain sex differentiation as well as it is in the gonad, some recent scientific findings led to this idea. First, the fish brain is the organ with the highest aromatase activity per unit of protein in

all vertebrates (Callard et al., 1993). Second, two different aromatase genes have been recently cloned in fish: one in the brain and another in the ovary (Kishida and Callard, 2001; Kwon et al., 2001). And, finally, some data suggest that the brain is the primary aromatization site in fish (Francis, 1992; Kwon *et al.*, 2001).

Previous *in vitro* studies in relation to androstenedione metabolism in the sea bass brain showed that a high percentage of the substrate remained unconverted or transformed into testosterone, the lowest values of formed metabolite corresponded to estrone and estradiol, and that an approximately 20% of radioactivity was unaccounted (González and Piferrer, 2002). The latter may represent 11 β -hydroxyandrogen synthesis.

In fish, 11 β -hydroxyandrogens rather than testosterone, as it had been thought, seem to be important for male sex differentiation (Baroiller *et al.*, 1999). In fact, it has been demonstrated that treatment with 11 β -hydroxyandrogens masculinize sexually undifferentiated gonads in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, (Van den Hurk *et al.*, 1989; Feist *et al.*, 1995), the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, (Baroiller and Toguyeni, 1996), and the common carp, *Cyprinus carpio* (Komen *et al.*, 1995). It has also been confirmed that 11 β -hydroxyandrogens inhibit ovarian aromatase gene expression in rainbow trout (Govoroun *et al.*, 2001), and are able to increase GnRH-secreting neuron size and decrease LH secretion from the pituitary of African catfish, *Clarias gariepinus* (Rebers *et al.*, 2000). Thus, 11 β -hydroxyandrogens may as well inhibit aromatase activity in the sea bass brain and ovary.

Inhibition of hypothalamic aromatase activity by 5 β -dihydrotestosterone (5 β -DHT) has been demonstrated in doves (Schumacher et al., 1991). In some species of birds, circulating estrogens masculinize the male brain (Hutchison et al., 1984). Then the main function of the high levels of 5 β -DHT, present in embryonic and post-hatching development, could be the protection of the female brain from the masculinizing effects

of androgens present in the plasma. However, in avian species, where the circulating estrogen demasculinize the neuroendocrine axis and reproductive behavior in female, the high levels of 5 β -DHT could protect the developing male brain from the demasculinizing effects of the circulating androgens. Schumacher et al., (1991) proposed two different hypotheses for the interaction between the aromatase and the 5 β -reductase: the competitive and the inhibitor hypothesis. The two enzymes seem to have an inverse relationship, because while 5 β -reductase was considerably higher in early stages of development when compared to in adulthood, aromatase was higher in adult animals. The competitive hypothesis would not explain these finding, because the two enzymes are not in the same compartment, since aromatase is localized in the microsomes, while 5 β -reductase is localized in the cytosol. The second hypothesis (inhibitory) seems more plausible (although the aromatase is not located in the same compartment than the 5 β -reductase), because the 5 β -reduced metabolites were able to inhibit aromatase (Schumacher et al., 1991).

Based on the above, the objective of this work was to determine whether 11 β -hydroxyandrogens had any effect on aromatase activity in the sea bass and if so to characterize the effects in the sea bass brain and ovary.

Materials and methods

Fish

Adult sea bass ranging from 200 to 700 g were purchased from commercial fish farms along the NE Coasts of Spain. Fish had been reared in floating net pens under natural conditions of temperature and photoperiod. Fish were sacrificed by a quick severing of the spinal cord after being numbed by keeping them in ice-chilled sea water. Tissues were obtained immediately or within 2 h after sacrifice. In the later case, fish were maintained

in ice-chilled seawater. Tissues were transported to the laboratory in tubes on crushed ice and were then either used immediately or frozen at -80°C . No differences were found in aromatase activity by using fresh or frozen tissues.

Radioisotopes and Reagents

Radiolabeled hormones, $[1\beta\text{-}^3\text{H}]\text{-Androstenedione}$ and $[7\text{-}^3\text{H}]\text{-Androstenedione}$ (specific activity 23.1-28.5 Ci/mmol and 22.5 Ci/mmol, respectively; New England Nuclear [NEN] Boston, MA), were purified prior to use, twice in ether-hexane (3:1, v/v) by thin layer chromatography (TLC) on silica gel plates (Merck, Barcelona, Spain). In order to calculate recovery, authentic tritiated water ($^3\text{H}_2\text{O}$) (NEN) was used. Reagents, inert steroids, and $11\beta\text{-hydroxylase}$ inhibitor (Mitotane) were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Merck (Barcelona, Spain) supplied the solvents, chloroform, ethanol, methanol, ether, hexane, and dichloromethane, which were of analytical grade. Novartis (Barcelona, Spain) donated the aromatase inhibitor, CGS 16949A (Fadrozole). The specific inhibitor of $17\beta\text{-hydroxysteroid dehydrogenase}$ ($17\beta\text{-HSD}$) type I, $16\alpha\text{-bromopropyl-estradiol}$ ($16\alpha\text{-BPE}$), which blocks the conversion of estrone into estradiol (Tremblay and Poirier, 1998; Luu-The *et al.*, 1995), and type III $17\beta\text{-HSD}$ inhibitor: $3\beta\text{-}$ (cyclohexylethyl)-androsterone ($3\beta\text{-CHA}$), which blocks the conversion of androstenedione into testosterone (Ngatcha *et al.*, 2000), were kindly donated by Dr. D. Poirier from the Centre Hospitalier Universitaire de Québec (Canada).

Aromatase assay

The tritiated water release assay optimized for the sea bass (González and Piferrer, 2002) was used. Briefly, radiolabeled $[1\beta\text{-}^3\text{H}]\text{-Androstenedione}$ and cofactors were preincubated at 37°C . Thirty minutes later, tissue homogenates were added and incubated for 30 min at 30°C . The reaction was stopped with TCA and placing the tubes on ice. The samples were centrifuged to precipitate the pellet containing proteins, which were

measured by the Lowry method (Lowry *et al.*, 1951). The supernatant was extracted with chloroform and washed with dextran-activated charcoal (DCC), then an aliquot of the supernatant was counted in a liquid scintillation counter. Ovarian microsomes were obtained by subsequent ultracentrifugations as described previously (González and Piferrer, 2002).

For the product isolation method (Prefontaine *et al.*, 1990) the incubation was similar to the one used for the tritiated water release assay, but the substrate in this case was 7-³H-Androstenedione (NEN), and the reaction was stopped by adding dichloromethane. Samples were extracted and chromatographed (TLC) twice in ether:hexane (3:1; v/v) and corresponding areas were scraped. The silica gel was dissolved in methanol, centrifuged and the solvent collected to measure radioactivity. The last process was repeated three times.

Data analysis

Within each experiment, three or four replicate determinations were used for each datapoint and all experiments were repeated at least twice. Each datapoint is the mean \pm standard error of the mean (SEM). To obtain the total activity (dpms), the dpms obtained from the liquid scintillation counter were multiplied by the dilution factor and the background subtracted, and corrected with the authentic tritiated water control for procedural losses. Aromatase activity was corrected by amount of protein and time and expressed as pmol/mg prot/h. To clarify the type of androgen-induced inhibition of aromatase and to calculate the inhibition constant (K_i) semi-inverse Dixon plots were used (De Arriaga *et al.*, 1998). Differences between treatments were analyzed by ANOVA or Student's *t*-test (Sokal and Rohlf, 1981). Post ANOVA comparison of means was carried out by Duncan's Multiple Range test. Differences were accepted as significant when $P < 0.05$.

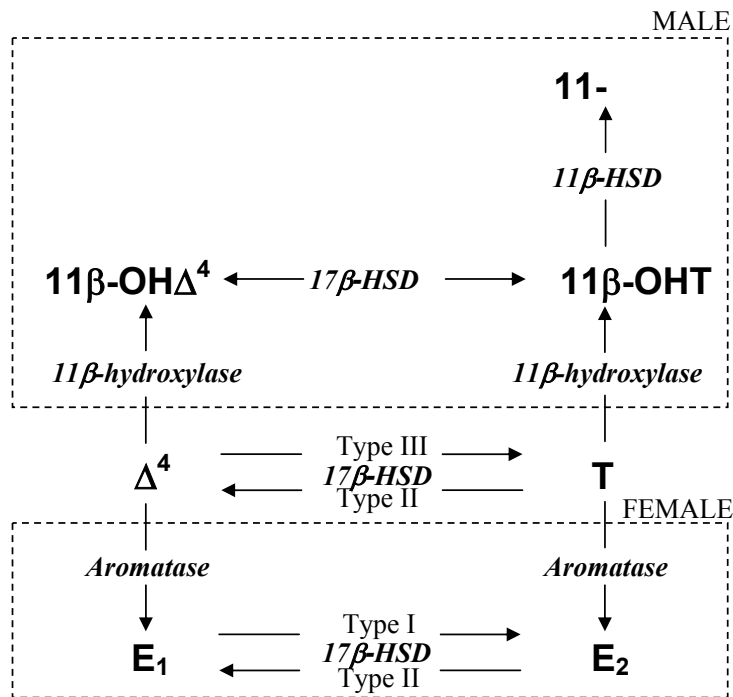


Fig. 21. Metabolism of androstenedione in fish. Proposed schematic representation of some steroidogenic pathways leading to male vs female gonadal sex differentiation in fish after in vitro metabolism, using androstenedione as substrate. Δ^4 = androstenedione; T = testosterone; E_1 = estrone; E_2 = estradiol; 11β -OH Δ^4 = 11β -hydroxyandrostenedione; 11 -KT = 11 -ketotestosterone; 11β -OHT = 11β -hydroxytestosterone; and 11β - and 17β -HSD = 11β - and 17β -hydroxysteroid dehydrogenase, respectively. The dashed lines indicate that estrogens, notably E_2 , are implicated in female sexual differentiation, while 11 -reduced-androgens, rather than testosterone, are implicated in male sexual differentiation in fish. The different types of 17β -HSD are also indicated. Modified from Baroiller et al., 1999.

Results

The tritiated water assay to measure aromatase activity in the sea bass had been previously validated with the product isolation method (González and Piferrer, 2002). In that study, it was determined the amount of unconverted substrate ($7\text{-}^3\text{H}$ -androstenedione), the different products of the aromatase reaction (estrone and estradiol), as well as the product of the $17\beta\text{-HSD}$ activity (testosterone and estradiol). Results showed a similar amount of unconverted substrate and testosterone, followed by lower amounts of estradiol and estrone. The $\sim 20\%$ of unaccounted radioactivity suggested that perhaps androstenedione was also being converted into 11β -hydroxyandrogens, a possibility that prompted us to conduct the experiments reported below.

Androstenedione metabolism

To test if there was 11β -hydroxyandrogen production in the sea bass brain from androstenedione, further incubations were performed followed separation of the different metabolites by TLC and quantification of the radioactivity. Results confirmed that T was the major detected product (~ 40 pmol/h) and showed that in fact there was as much or even higher $11\beta\text{-OH}$ androgen production as estrogen production ($E_1 + E_2$: 1.7 pmol/h vs $11\beta\text{-OH}\Delta^4 + 11\beta\text{-OHT}$: 1.9 pmol/h) (Fig. 22).

In order to prevent the abundant conversion of Δ^4 into testosterone and thus redirect most of the substrate towards aromatase or 11β -hydroxylase, specific inhibitors of the 17β -hydroxysteroid dehydrogenase ($17\beta\text{-HSD}$) were used: type I inhibitor $16\alpha\text{-BPE}$ and type III inhibitor $3\beta\text{-CHA}$. In the presence of $3\beta\text{-CHA}$, the amount of androstenedione that remained unconverted doubled ($P < 0.01$) because $3\beta\text{-CHA}$ significantly inhibited T production ($P < 0.01$) to less than 50% of the value in the absence of inhibitors. Similarly, estrone production significantly ($P < 0.05$) increased in the presence of $16\alpha\text{-BPE}$ while estradiol production decreased 31.2%. As a result of $17\beta\text{-HSD}$ type I and type III inhibition, $11\beta\text{-OH}\Delta^4$ significantly ($P < 0.05$) increased. Since the $17\beta\text{-HSD}$ inhibitors

used are not designed to inhibit the conversion of $11\beta\text{-OH}\Delta^4$ to $11\beta\text{-OHT}$ (Luu-The et al., 1995; Tremblay and Poirier, 1998; Ngatcha et al., 2000), the latter also significantly ($P < 0.01$) increased.

Fig. 22. In vitro metabolism of androstenedione in sea bass brain in the absence or presence of specific 17β -hydroxysteroid dehydrogenase ($17\beta\text{-HSD}$) enzyme inhibitors. Brain homogenates were incubated for 30 min with 150 nM $7\text{-}^3\text{H}$ -androstenedione ($7\text{-}^3\text{H}\text{-}\Delta^4$) as the substrate in the absence or presence of 100 μM each of 16α -bromopropyl-estradiol ($16\alpha\text{-BPE}$) and 3β -(cyclohexylethyl)-androsterone ($3\beta\text{-CHA}$), inhibitors of $17\beta\text{-HSD}$ type I and type III, respectively. Following solvent extraction, the parent compound, androstenedione (Δ^4), formed metabolites (T = testosterone; E_1 = estrone; E_2 = estradiol; $11\beta\text{-OH}\Delta^4$ = 11β -hydroxyandrostenedione; and $11\beta\text{-OHT}$ = 11β -hydroxytestosterone) were separated by thin layer chromatography and counted in a liquid scintillation counter. Significant differences: * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, NS = not significant. Data as mean \pm SEM, representative of three separate experiments.

$11\beta\text{-OH}\Delta^4$ effects on brain aromatase activity

To analyze the effects of 11 β -hydroxyandrogens on aromatase activity, sea bass brain homogenates were incubated in the presence of different concentrations of 11 β -OH Δ^4 , 11 β -OHT, Fadrozole and 4OH Δ^4 . The last two compounds are known aromatase inhibitors and were used as a positive controls. In a sea bass standard aromatase assay, 11 β -OH Δ^4 inhibited sea bass brain aromatase in a dose-dependent manner and showed the typical pattern of an inhibitor with a sigmoid curve when the results were plotted in a semi-logarithmic plot.

Fig. 23. Effect of 11 β -hydroxy-androstenedione (11 β -OH Δ^4) and 11 β -hydroxytestosterone (11 β -OHT) on sea bass brain aromatase activity. Brain homogenates were incubated for 30 min with 150 nM 1 β -³H-androstenedione as the substrate in the presence of increasing concentrations of 11 β -OH Δ^4 or 11 β -OHT. The inhibitors of aromatase activity, CGS 16949A (Fadrozole) and 4-hydroxyandrostenedione (4OH- Δ^4) were used as positive controls. In the absence of inhibitors, the basal aromatase activity was 4.9 ± 1.7

pmol/mg prot/h. The concentration at which aromatase activity was reduced to 50% (IC_{50}) was calculated by the interpolation to the x-axis. Data as mean \pm SEM, and representative of fifteen separate experiments.

However, the structurally closely related 11β -OHT did not have any inhibitory effect at all, indicating the specificity of the former to inhibit aromatase activity. The estimated IC_{50} of the 11β -OHA⁴ from the plot was only one and two orders of magnitude higher than those of the two potent aromatase inhibitors. Fadrozole was more potent than $4OHA^4$ in inhibiting sea bass brain aromatase.

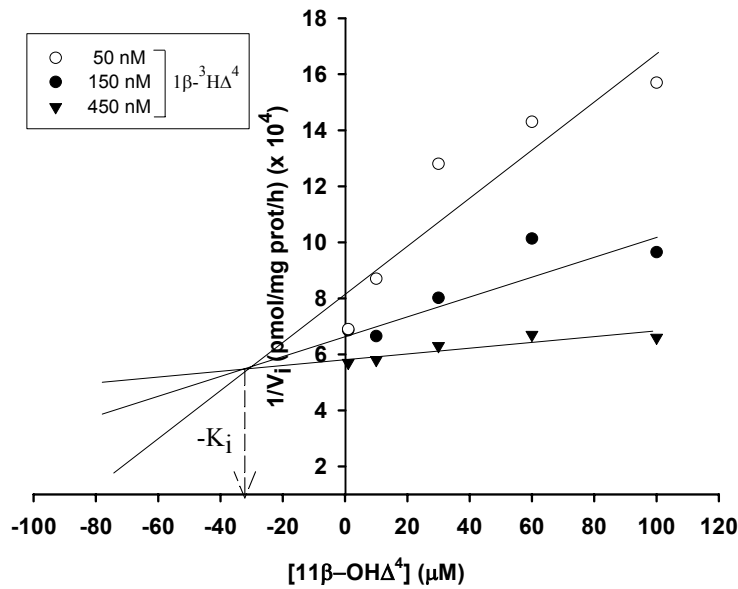


Fig. 24. Dixon semi-inverse plot to estimate the inhibition constant (K_i) of 11β -hydroxy-androstenedione (11β -OHA⁴) on sea bass brain aromatase activity. Brain homogenates were incubated with three different concentrations (50, 150 and 450 nM) of 1β -³H-androstenedione (1β -³HΔ⁴) used as a substrate for aromatase, in the presence of increasing concentrations of 11β -OHA⁴. The concentration of 11β -OHA⁴ at which the regression lines of the datapoints corresponding to each concentration of substrate cross each other is $-K_i$. Data are representative of two different experiments.

Inhibition type and constant (K_i) in brain

In order to better characterize the type of inhibition, brain homogenates were incubated with different substrate concentrations using 150 nM as the middle concentration, which corresponds to the substrate concentration in a standard sea bass aromatase assay. This was carried out in the presence of increasing inhibitor concentrations. The type of inhibition was determined in a Dixon semi-inverse plot. The K_i value was calculated from the regression lines (corresponding to each substrate concentration) at the point where they cross each other. It was determined that the $11\beta\text{OH}\Delta^4$ inhibition of brain aromatase was of the linear (total) type and competitive with an estimated $K_i = 36.5 \pm 3.5 \mu\text{M}$ (Fig. 24). However, when the substrate concentrations were reduced from 50, 150 and 450 nM to 4, 10 and 20 nM, to avoid substrate saturation, the Dixon plot (Fig. 25) more appropriately revealed an K_i one order of magnitude lower than that with higher substrate concentrations, 2.8 μM instead of 36.5 μM .

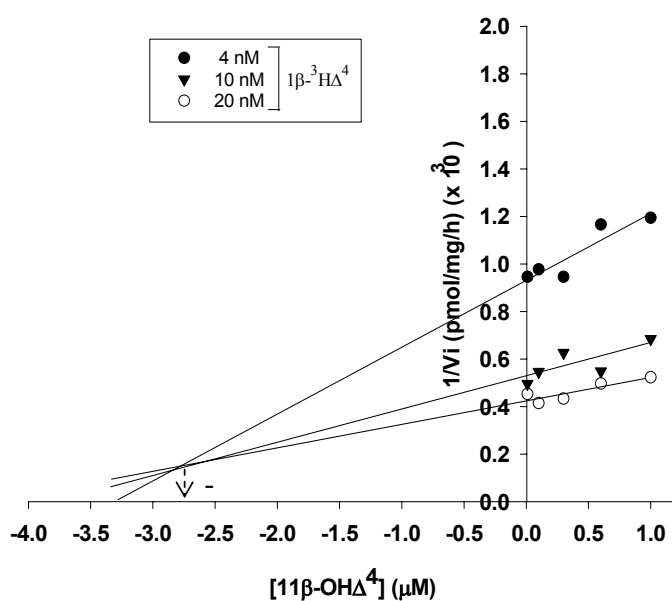


Fig. 25. Dixon semi-inverse plot to estimate the inhibition constant (K_i) of 11β -hydroxy-androstenedione (11β -OHA 4) on sea bass brain aromatase activity. Brain homogenates were incubated with three different concentrations (4, 10 and 20 nM) of 1β - 3 H-androstenedione (1β - 3 H 4) used as a substrate for aromatase, in the presence of increasing concentrations of 11β -OHA 4 . The concentration of 11β -OHA 4 at which the regression lines of the datapoints corresponding to each concentration of substrate cross each other is $-K_i$. Data are representative of two different experiments.

11β -OHA 4 effects on ovarian aromatase activity

Once it was demonstrated that 11β -OHA 4 inhibited the sea bass brain aromatase activity and that the closely related 11β -OHT did not, the effects of 11β -OHA 4 were tested also in the ovary. In this case, ovarian microsomes were used to concentrate aromatase, because of the lower activity per unit of protein in ovary than in brain (González and Piferrer, 2003). Microsomes were incubated with different concentrations of 11β -OHA 4 and Fadrozole in a sea bass standard aromatase assay.

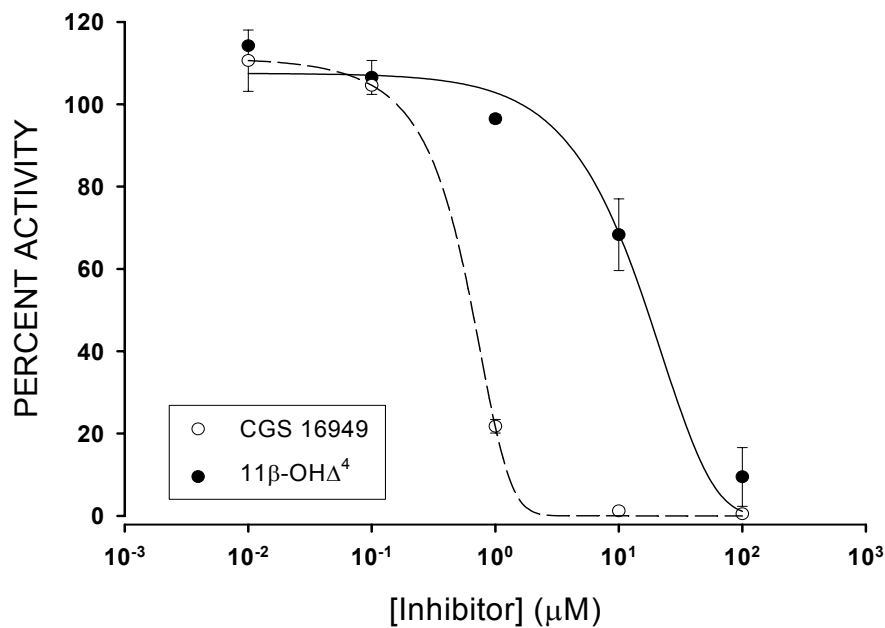


Fig. 26. Effect of 11 β -hydroxyandrostenedione (11 β -OH Δ^4) on sea bass ovarian aromatase activity. Ovarian microsomes were incubated for 30 min with 150 nM 1 β -³H-androstenedione as the substrate in the presence of increasing concentrations of different concentration of 11 β -OH Δ^4 . CGS 16949A (Fadrozole) was used as a known inhibitor of aromatase activity as a positive control. In the absence of inhibitors, the basal aromatase activity was 4.0 \pm 1.9 pmol/mg prot/h. The concentration at which aromatase activity was reduced to 50% (IC₅₀) was calculated by the interpolation to the x-axis. Data as mean \pm SEM, and representative of two separate experiments.

Results (Fig. 26) revealed that 11 β -OH Δ^4 was also capable to completely inhibit the ovarian aromatase activity in a dose-dependent manner. The IC₅₀ of 11 β -OH Δ^4 (\sim 47.3 μ M) was two orders of magnitude higher than that of fadrozole (\sim 0.5 μ M).

Inhibition type and constant (K_i) in ovary

As in the case with the brain, Dixon semi-inverse plots were used to estimate the K_i and the type of inhibition. The ovarian inhibition by 11 β -OH Δ^4 was also reversible and of competitive total type. The estimated K_i was 47.3 \pm 4.7 μ M (Fig. 27).

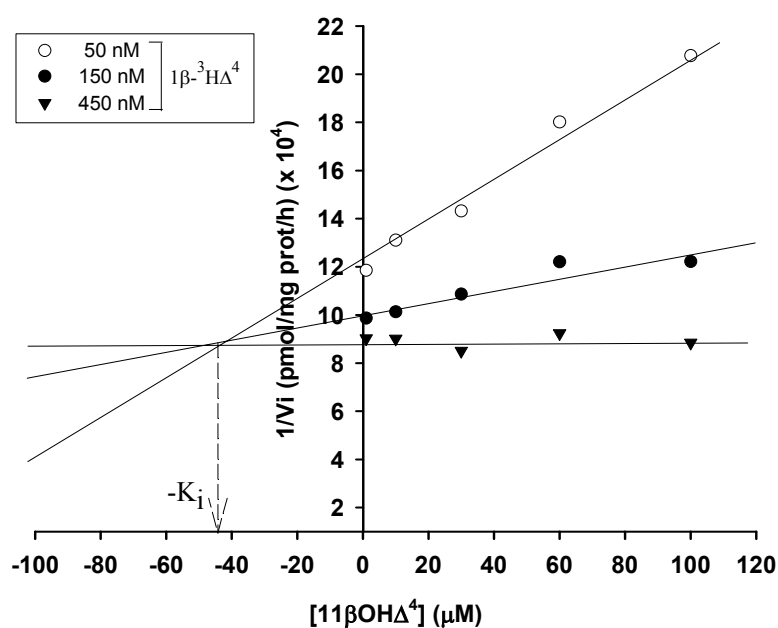


Fig. 27. Dixon semi-inverse plot to estimate the inhibition constant (K_i) of 11β -hydroxy-androstenedione (11β -OHA⁴) on sea bass ovarian aromatase activity. Ovarian homogenates were incubated with three different concentrations (50, 150 and 450 nM) of 1β -³H-androstenedione (1β -³H Δ ⁴), used as a substrate for aromatase, in the presence of increasing concentrations of 11β -OHA⁴. The concentration of 11β -OHA⁴ at which the regression lines of the datapoints corresponding to each concentration of substrate cross each other is $-K_i$. Data are representative of two different experiments.

In the ovary, it was not possible confirm whether the K_i varies after decreasing the substrate concentration, because the fishes used were obtained in the summer, when aromatase activity was practically nule and the inhibitory effect could not be detected.

Reversibility

The reversibility of the 11β -OHA⁴ effects on aromatase was further tested by the inhibition of the 11β -H (enzyme responsible of the conversion of androstenedione into 11β OHA⁴). For this purpose, a specific inhibitor of 11β -H, mitotane, was added to the incubation media, resulting in a higher aromatase activity than in the control, because the control supposedly contains the endogenous hormone which is inhibiting aromatase activity.

Fig. 28. Reversibility of the inhibiting effects of 11 β -hydroxyandrostenedione (11 β -OHA⁴) on sea bass brain aromatase activity. Brain homogenates were incubated in the absence (CTRL) or presence of 100 μ M of CGS 16949A (CGS), 11 β OHA⁴, 1.5 μ M of the specific inhibitor of 11 β -Hydroxylase, mitotane (Mit), or 11 β OHA⁴ + Mit. Data are the mean \pm SEM and representative of 1000 H⁴ and 100 H⁴ experiments. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$). Similarity (11 β OHA⁴ + Mit) is observed in the presence of exogenous 11 β OHA⁴, that means, there are presence of the aromatase activity exogenous inhibitor and the enzyme responsible of the production of endogenous aromatase activity inhibitor is blocked. For that reason, the inhibition of the aromatase activity in the presence of these two compounds was lower than when only the exogenous 11 β OHA⁴ was added (Fig. 28).

Discussion

In this study, it has been discovered that 11 β -OHA⁴ is able to inhibit aromatase activity in the brain and ovary of the sea bass, and that this inhibition is competitive, total and reversible. This research was prompted by our previous observation that when sea bass brains were incubated with 1 β -³H Δ ⁴ it was found that, like the situation in the goldfish (Pasmanik and Callard, 1985), most of the substrate remained unconverted, followed by the production of T and a lower production of E₂ and E₁ due to aromatase activity. The difference between sea bass and the goldfish was in the amount of T production, since in the former high levels of this androgen were produced but in the goldfish only 10% of the substrate was converted into T, suggesting a higher 17 β -HSD activity than aromatase activity in the sea bass. In this study it has been demonstrated the production of 11 β -hydroxyandrogens using androstenedione as substrate, showing a higher presence of 11 β -H activity than aromatase activity in the sea bass brain since both in the presence or

absence of specific inhibitors of 17 β -HSD the production of 11 β -OHA⁴ was consistently higher than that of E₁.

Although the presence of 11 β -hydroxyandrogens was detected, only 11 β -OHA⁴ was able to inhibit the aromatase activity, whereas the structurally- and closely-related 11 β -OHT did not inhibit aromatase activity. It has also been demonstrated that even enantiomers could have strongly differences such one being inhibitor and the other not (Hutchison *et al.*, 1996). These findings suggest that the endogenous androgen 11 β -OHA⁴ can act as aromatase inhibitor. In this regard, Callard *et al.*, (1981) tested the effects of 11 β OHT and 11-ketotestosterone (11KT) in the sculpin (*Myoxocephalus decimspinosus*), but none of them inhibited aromatase activity, because the oxygen function at C11 position probably prevents binding to the aromatase complex, but this should apply to 11 β -OHA⁴ but apparently it does not, given our results (see below). Although 11-KT is one of the main androgens in fish (Borg, 1994), we did not test its effects on aromatase activity because the previous results of Pasmanik and Callard (1981) in goldfish cited above and especially because its precursor, 11 β -OHT, did not inhibit aromatase activity either in the sea bass.

Once the inhibitory effects of 11 β -OHA⁴ were demonstrated, its IC₅₀ was compared with that of known potent aromatase inhibitors, such as 4OHA⁴ and fadrozole, showing that it was only one and two orders of magnitude higher, respectively. However, when the substrate concentrations of the assay were decreased one order of magnitude, the resulting K_i was also one order of magnitude lower approaching a physiologically more meaningful value. Furthermore, the estimated values of IC₅₀ for sea bass from the dose-dependent plot were similar to the found in rat, hamster and human tissues (Davies *et al.*, 1992; Hausler *et al.*, 1989; Ayub and Levell, 1990, respectively).

A similar example on aromatase inhibition by an andogenous androgen was observed in doves, where 5 β -dihydrotestosterone (5 β -DHT) inhibited hypothalamic aromatase activity (Schumacher *et al.*, 1991). The pattern of the Dixon semi-inverse plot of the sea bass aromatase inhibition by 11 β -OHA⁴ both in brain and ovary was the typical when the inhibitor is structurally similar to the most common substrate of the tested enzyme, which resulted in a reversible, total and competitive inhibition type. Regarding the question whether 11 β -OHA⁴ could be competing with androstenedione for aromatase, it has been demonstrated in a placental microsome system that this androgen is not a substrate for aromatization (Ryan, 1963). Therefore, like the situation with 5 β -DHT in doves (Schumacher *et al.*, 1991), it seems that 11 β OHA⁴ decreases aromatase activity because of a direct inhibition of the enzyme rather than through competition with androstenedione.

Previously reported effects of 11 β OHA⁴ in fish include the masculinization of several species: rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Van den Hurk *et al.*, 1989; Feist *et al.*, 1995), Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Baroiller and Toguyeni, 1996), and the common carp, *Cyprinus carpio* (Komen *et al.*, 1995) by oral treatments of sexually undifferentiated fish. The expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD) and aromatase genes was also inhibited with a treatment of ten days with 11 β OHA⁴ (Govoroun *et al.*, 2001). It has also been shown a decrease in aromatase gene expression following masculinizing treatment with a synthetic androgen in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Kitano *et al.*, 2000). The masculinization could be due to a reduction of estrogen production because the inhibited expression gene was a specific gonadal gene.

Recently, it has been suggested a key role for aromatase and estrogens in ovarian differentiation (Guiguen *et al.*, 1999) and for 11 β -Hydroxylase and 11 β -oxygenated androgens in testicular differentiation (Guiguen *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001). It has also

been demonstrated that aromatization is necessary for the indirect effects of androgens on the nervous system, because the final effect is generated by the estrogen formed from the androgen (Hutchison, 2000). To prove this affirmation, there is evidence that exists a high production of T during the puberty by the testes which will be converted to E₂ in the pituitary (Cavaco *et al.*, 2001). Another key component in the brain-pituitary-gonadal axis is the gonadotrophin-releasing hormone, which was affected in African catfish (cf), *Clarias gariepinus*, by treatment with 11 β -OH Δ^4 which augmented the GnRH-secreting neuron size (Dubois *et al.*, 1998). In the African catfish, 11 β OH Δ^4 and 11-ketotestosterone (11KT) stimulated testicular development. However, the 11-oxygenated steroids did not seem to be implicated in the maturation of the cfGnRH system during the puberty. Together these results demonstrated the implication of 11 β -OH androgens in the brain-pituitary-gonadal axis. In the sea bass, results were obtained in adult fish, and thus further research is needed to test if the inhibitory effect of 11 β -OH Δ^4 is also observed in younger animals, and therefore their implication in the control of brain and gonadal estrogen synthesis during early development, e.g., during sex differentiation. In this regard, in doves, 5 β -reductase inhibited the hypothalamic aromatase, especially during embryonic and post-hatching life, a stage that coincided with the highest sensitive period of the brain to the effects of steroid hormones (Schumacher *et al.*, 1991). Further research is needed on the ontogeny of sea bass aromatase, but the endogenous androgen 11 β OH Δ^4 perhaps also could change the sensibility of the brain cells to circulating androgens during the first year of life, thus affecting the sexual differentiation of this organ.

Acknowledgements

Supported by CICYT grant MAR96-1860 and EU grant Q5RS-2000-31365 to F.P. A.G. was supported by a doctoral fellowship from the Ministry of Science and Technology

(MCyT) from Spain. We thank to Dr. D. Poirier (Université Laval, Canada) for donating the 17 β HSD inhibitors and Novartis (Barcelona) for the CGS 16949 (Fadrozole).

Literature cited

Ayub, M., and Levell, M.J. (1990). The inhibition of human prostatic aromatase activity by imidazole drugs including ketoconazole and 4-hydroxyandrostenedione. *Biochem. Pharmacol.* 40, 1569-1575.

Baroiller, J.F., Chourrout, D., Fostier, A., and Jalabert, B. (1995). Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.* 273, 216-233.

Baroiller, J.F., and Toguyeni, A. (1996). Comparative effects of a natural steroid, 11 $\alpha\beta$ -hydroxy-androstenedione (11 $\alpha\beta$ -OH- Δ 4) and a synthetic androgen, 17 α -methyltestosterone (17 α -MT) on sex ratio in *Oreochromis niloticus*. In: Pullin, R.S.V., Lazard, J., Legendre, M., Amon Kothias, J.B., Pauly, D., editors. Proceeding of the third international symposium on tilapia aquaculture. Abidjan, Côte d'Ivoire. pp. 344-351.

Baroiller, J.F., Guiguen, Y., and Fostier, A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 910-931.

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

Callard, G.V., Petro, Z., and Ryan, K.J. (1981). Estrogen synthesis *in vitro* and *in vivo* in the brain of a marine teleost (*Myoxocephalus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 43, 243-255.

Callard, G.V., Drygas, M., and Gelinas, D. (1993). Molecular and cellular physiology of aromatase in the brain and retina. *Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44, 541-547.

Cavaco, J.E.B., Bogerd, J., Goos, H., and Schulz, R.W. (2001). Testosterone inhibits 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol. Reprod.* 65, 1807-1812.

Davies, J.H., Shearer, R.J., Rowlands, M.G., Poon, G.K., Houghton, J., Jarman, M., and Dowsett, M. (1992). Effects of 4-hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione and its metabolites on 5 alpha-reductase activity and the androgen receptor. *J. Enzyme Inhib.* 6, 141-147.

D'cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M., and Baroiller, J.F. (2001). Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 265-276.

De Arriaga, M.D., Soler, J., Busto, F., and Cadenas, E. (1998). Manual de ejercicios de cinética enzimática. 2ª Ed. Secretariado de publicaciones. Universidad de León. 305 p.

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

Feist, G., Yeoh, C.G., Fitzpatrick, M.S., and Schreck, C.B. (1995). The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17alpha-methyltestosterone and 11-beta-hydroxyandrostenedione. *Aquaculture*. 131, 1-2.

Francis, R.C. (1992). Sexual lability in teleosts: Developmental factors. *Q. Rev. Biol.* 67, 1-18.

González, A., and Piferrer, F. (2002). Characterization of aromatase activity in the sea bass. Effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *J. Exp. Zool.* 293, 500-510.

González, A., and Piferrer, F. (2003). Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* (In press).

González-Martínez, D., Madigou, T., Zmora, N., Anglade, I., Zanuy, S., Zohar, Y., Elizur, A., Muñoz-Cueto, J.A., and Kah, O. (2001). Differential expression of three different prepro-GnRH (Gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Comp. Neurol.* 429, 144-155.

Govoroun, M., McMeel, O.M., D'Cotta, H., Ricordel, M.J., Smith, T., Fostier, A., and Guiguen, Y. (2001). Steroid enzyme gene expressions during natural and androgen-induced gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.* 290, 558-566.

Guiguen, Y., Baroiller, J.F., Ricordel, M.J., Iseki, K., McMeel, O.M., Martin, S.A., and 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.

Guiguen, Y., Govoroun, M., D'Cotta, H., McMeel, O.M., and Fostier, A. (2000). Steroids and gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E., Stefansson, S.O., editors. *Proceedings of*

the sixth international symposium on the reproductive physiology of fish. Bergen, Norway. pp. 241-243.

Hausler, A., Schenkel, L., Krahenbuhl, C., Monnet, G., and Bhatnagar, A.S. (1989). An in vitro method to determine the selective inhibition of estrogen biosynthesis by aromatase inhibitors. *J. Steroid Biochem.* 33, 125-131.

Hutchison, J.B. (2000). Estrogen in gender-specific neural differentiation. In: Matsumoto, A. (Ed.), *Sexual Differentiation of the Brain*. CRC, New York, pp. 58-82.

Hutchison, J.B., Wozniak, A., Beyer, C., Hutchison R.E. 1996. Regulation of sex-specific formation of oestrogen in brain development: Endogenous inhibitors of aromatase. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 56, 201-207.

Kishida, M., and Callard, G.V. (2001). Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in Zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology.* 142, 740-750.

Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y., and Abe, S.I. (2000). Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol. Reprod. Dev.* 56, 1-5.

Komen, J., Lambert, J.G.D., Richter, C.J.J., and Goos, H.J.T. (1995). Endocrine control of sex differentiation in XX female, and in XY and XX male common carp (*Cyprinus carpio*, L). In: Goetz, F., Thomas, P., editors. *Proceedings of the fifth international symposium on the reproductive physiology of fish*. Austin, Texas. p. 383.

Kwon, J.Y., Haghpanah, V., Kogson-Hurtado, L.M., McAndrew, B.J., and Penman, D.J. (2000). Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *J. Exp. Zool.* 287, 46-53.

Kwon, J.Y., McAndrew, B.J., and Penman, D.J. (2001). Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 359-370.

Liu, S., Govoroun, M., D'Cotta, H., Ricordel, M.J., Lareyre, J.J., McMeel, O.M., Smith, T., Nagahama, Y., and Guiguen, Y. (2001). Expression of cytochrome P45011 α β (11 α β -hydroxylase) gene during gonadal sex differentiation and spermatogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 75, 291-298.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein determination with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Luu-The, V., Zhang, Y., Poirier, D., and Labrie, F. (1995). Characteristics of human types 1, 2 and 3 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities: oxidation/reduction and inhibition. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 55, 581-587.

Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X., and Nagahama, Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. *J. Exp. Zool.* 281, 362-372.

Ngatcha, B.T., Luu-The, V., and Poirier, D. (2000). Androsterone 3 β -substituted derivatives as inhibitors of type 3 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 2533-2536.

Pasmanik, M., and Callard, G.V. (1985). Aromatase and 5 α -reductase in the teleost brain, spinal, cord, and pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60, 244-251.

Piferrer, F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish, *Aquaculture.* 197, 229-281.

Piferrer, F., Zanuy, S., Carrillo, M., Solar, I., Devlin, R., and Donaldson, E. (1994). Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *J. Exp. Zool.* 270, 255-262.

Prefontaine, M., Shih, C., Pan, C.C., and Bhavnani, B.R. (1990). Applicability of product isolation and the radiometric aromatase assays for the measurement of low levels of aromatase: lack of aromatase activity in the human endometrium. *Endocrinology.* 127, 539-551.

Rebers, F.E.M., Hassing, G.A.M., Zandbergen, M.A., Goos, H.J.Th., and Schulz, R.W. (2000). Regulation of steady-state luteinizing hormone messenger ribonucleic acid levels, de novo synthesis, and release by sex steroids in primary pituitary cell cultures of male African catfish, *Clarias gariepinus*. *Biol. Reprod.* 62, 864-872.

Ryan, K.J. (1963). Biogenesis of estrogens. In: *Proceedings, 5th International Congress of Biochemistry.* Vol. VII. Pergamon, New York. pp. 381-394.

Schumacher, M., Hutchison, J.B., and Hutchison, R.E. (1991). Inhibition of hypothalamic

aromatase activity by 5beta-dihydrotestosterone. *J. Neuroendocrinol.* 3, 221-226.

Sokal, R.R., and Rohlf, F.J. (1981). *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.* (2nd Ed.) New York, W.H. Freeman and Co. p. 859.

Tremblay, M.R., and Poirier, D. (1998). Overview of a rational approach to design type I 17β-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors without estrogenic activity: chemical synthesis and biological evaluation. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 66, 179-191.

Van den Hurk, R., Richter, C.J.J., and Janssen-Dommerholt, J. (1989). Effects of alpha-methyltestosterone and 11beta-hydroxy-androstenedione on gonad differentiation in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture.* 83, 179-191.

CAPÍTULO V

SEX-RELATED DIFFERENCES IN THE ONTOGENY OF BRAIN AND GONADAL AROMATASE ACTIVITY DURING THE FIRST YEAR OF LIFE IN THE SEA BASS (*Dicentrarchus labrax*)

González, A., Papdaki, M., Mylonas, C., and Piferrer, F. 2003. Sex-related differences in the ontogeny of brain and gonadal aromatase activity during the first year of life in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). (En preparación).

Abstract

The ultimate goal of this study was to elucidate the possible implication of aromatase activity in the process of sex differentiation (SD) in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). In order to obtain one male- and one female-dominant group for samplings, several gradings were performed to separate small from large fish starting at 56 days post hatching (DPH). Every ~50 days, samples of brain and gonad were taken to analyze the aromatase activity until 298 DPH. The size grading resulted in a group of large fish with 96% of females; 59.1% in the control group and 35.4% females in the small group. The weight and length of the fish of the different groups increased until 198 DPH, when differences between groups started to be more evident. The maximum values found at 298 DPH were ~130 g in weight and ~20 cm in length. Regarding aromatase activity, brain aromatase activity of both large and small group augmented from ~15 fmol/mg prot/h at 56 DPH to 550 fmol/mg prot/h at 298 DPH, with a peak of ~300 fmol/mg prot/h at 198 DPH with no differences between L- and S- groups. However, in the gonads aromatase activity was significantly higher in the L-group already at 100 DPH, and the peak of aromatase activity was found at 248 DPH with values higher than 2 pmol/mg prot/h in the large group and 0.8 pmol/mg prot/h in the small one. The aromatase activity in the small group decreased to undetectable values at 298 DPH, while the aromatase activity of the large group showed a slightly decrease at this time without significant differences with respect to the 248 DPH sampling. The phenotypic sex could be histologically determined as early as 143 DPH (~90 mm length), i.e., about one month later than the differences in aromatase activity between the gonads of the L- vs S-group. Around 250 DPH gonads were already well differentiated, and showed maximum values of aromatase activity similar to those reached by adults in the spawning season. The aromatase activity of the small group showed a decrease at 298 DPH that could reflect the non-requirement of estrogen production for testis development, because eventually all the fishes of the small group at this age were males. Together, these results suggest that the brain may be the

primary aromatization site in the sea bass, and the implication of aromatase activity in the initial gonadal development in both sexes, with an extra and continued aromatase activity requirement for specific ovarian development and no further estrogen synthesis for male development.

Introduction

Yamamoto (1953) demonstrated that with suitable doses of steroid hormones it was possible to modify the process of sex differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). Later, he concluded that steroid hormones were “natural sex inducers” in fish (Yamamoto, 1969). Nowadays, it has been confirmed Yamamoto’s affirmation by molecular, biochemical and morphological studies in fish. Bogart (1987) considered that testosterone and estradiol were the main steroids responsible of the sex differentiation. Recently, it has been suggested an important function for P450 aromatase and estrogens in ovarian differentiation (Guiguen *et al.*, 1999) and for 11 β -hydroxylase and 11 β -oxygenated androgens rather than testosterone, as it was traditionally thought, for testicular differentiation (Baroiller *et al.*, 1999; Guiguen *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001). Regarding aromatase, the enzyme that transforms androgens into estrogens, there are several studies for its implication on sex differentiation in fish. For example, treatment with estrogens allows the feminization of several fish species (Piferrer, 2001; Devlin and Nagahama, 2002). Further, treatment of sexually undifferentiated genotypic females with a specific aromatase inhibitor resulted in the development of phenotypic males in several species of teleosts: chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Piferrer *et al.*, 1994); Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Baroiller *et al.*, 1995; Kwon *et al.*, 2000); rainbow trout, *O. mykiss* (Guiguen *et al.*, 1999); and Olive flounder, *Paralychthys olivaceus* (Kitano *et al.*, 2000). Recently, molecular studies have demonstrated that in a species with both genetic and environmental sex determination (Nile tilapia), aromatase plays a decisive role in ovarian differentiation while its repression appears to be necessary for male

differentiation (Kwon *et al.*, 2001; D’Cotta *et al.*, 2001). Similar results were found when the aromatase protein was analyzed during gonadal differentiation, since it was only present during ovarian but not during testicular differentiation (Nakamura *et al.*, 1998).

Two different aromatase genes have been recently identified in some fish species: one in brain and other in ovary (Kishida and Callard, 2001; Kwon *et al.*, 2001), and based on their expression it has been suggested that the brain could be the primary aromatization site in fish (Francis, 1992; Kwon *et al.*, 2001).

There are evidences that sex differentiation in the sea bass is the result of genetic (Saillant *et al.*, 2002) and environmental interactions (Blázquez *et al.*, 1998; Pavlidis *et al.*, 2000; Koumoundouros *et al.*, 2002). Within the brain-pituitary-gonad axis, sex-determining genes, brain and pituitary hormones, growth factors, steroidogenic enzymes, sex steroids, and sex steroid receptors contribute to the development and differentiation of the gonads. Thus, it would be interesting to establish if there is a sexually-related expression and action of the mentioned factors that are presumably implicated in the process of sex differentiation. The objective of this work, therefore, was to study the temporal evolution of aromatase activity during ontogeny in sea bass including the period encompassing sex differentiation to determine the changes of aromatase activity with respect to sex and its possible connection with the process of sex differentiation.

Materials and methods

Fish and rearing conditions

Fertilized sea bass eggs (~846.000 eggs; 78% fertilization success) were collected from a natural spawn on 20 February 2001. Once the eggs hatched (survival from egg to fry 87%), the mesocosm rearing method was used to prevent the possible interference of stress during the time of sex differentiation, keeping both hatched larvae and fry in large

(40 m³) circular tanks, feeding progressively with rotifer (*Brachionus plicatilis*), freshly hatched or enriched with *Artemia* spp. and finally with commercial feed. Until 60 days post hatch (DPH), automatic feeders were used; from 60 to 100 DPH, some demand feeders were added in order to train the fry to feed on-demand, and after 100 DPH only demand feeders were used.

The tanks were fitted with airstones at the perimeter, providing gentle agitation of the water column. The daily water exchange was 10% of the volume during the first 5 days, increasing to 20% for the next 5 days and gradually to 100% around 25 DPH when artificial food was being offered, and to 200% by 48 DPH. The dissolved oxygen decreased until 61 DPH from 8.6 to 5.8 mg/l. The salinity was determined twice per week and oscillated from 36 to 39 g/l. The mean water temperature during the study ranged from a minimum of 15.5°C in February, increasing gradually to the annual maximum of 25°C in July. Between June and October, a mixture of water at 21°C was added to prevent extremes in water temperature, which can lead to disease outbreaks.

Production of male- and female-dominant groups of sea bass

Male- and female-dominant groups were produced by repeated gradings based on size, taking into account the fact that in sea bass there is an association between somatic growth and phenotypic sex differentiation early in development in that the large fish are usually females and the small fish are usually males (Blázquez et al., 1998; Blázquez et al., 1999). Gradings took place when fish were around 2, 4, 5 and 7 months of age (Fig. 29). Beginning at 66 DPH, fish were separated according to size producing a large and a small group. Every group was grown in separate tanks as well as an ungraded control group kept from the initial group. The second grading was performed at 123 DPH in the small group and at 143 DPH in the large group; the third grading took place at 166 and 167 DPH, respectively, and the fourth at 223 and 224 DPH, respectively (Fig. 29). Efforts were made to maintain the density of each tank at 3-6 Kg/m³ after each grading. The first

two gradings were carried out with commercially available bar-graders that separate fish according to their girth (width). The last two gradings were made manually based of the total length of the fish. Some groups of intermediate size were discarded. At the end, the groups available were control, L-extreme and S-extreme (Fig. 29).

Sampling

Tissue samples were collected at 56, 98, 151, 198, 248, and 298 DPH. At each sampling, the gonads of 15-20 fish were histologically examined in order to identify phenotypic sex as early as possible. From 248 DPH and onwards, sex could also be determined by a microscopic examination of a gonad squash. At the same time, length, weight and, when feasible, the gonadosomatic index (IGS), were determined (248 and 298 DPH).

Samples were frozen in liquid N₂ in 0.5 ml Eppendorf tubes. Once frozen, the samples were kept at -84°C until analysis. The growth of the three groups (total length and wet weight) was monitored every 15-25 days. The final sex ratio of the three populations was determined in the sampling at 298 DPH (n = 100 fish per population).

Aromatase assay

The determination of the aromatase activity in brain and gonads was carried out by the tritiated water release assay previously optimized for the sea bass (González and Piferrer, 2002). Briefly, a NADPH-generating system was preincubated 30 min at 37°C together with [1β -³H]-androstenedione (Esp. Act. 23.1-28.5 Ci/mmol; New England Nuclear [NEN] Boston, MA) at 150 nM. After 30 min, 10 mg of tissue homogenate (in 50 mM phosphate buffer, 1:10; w:v) were added and incubated during 30 min at 30°C. The reaction was stopped by adding trichloroacetic acid and placing the tubes on ice. Samples were centrifuged and the supernatants were extracted with chloroform. The aqueous phase was washed with dextran coated charcoal (DCC), centrifuged and one aliquot was

counted in a liquid scintillation counter. The proteins were determined by the Lowry method using BSA as a standard (Lowry *et al.*, 1951).

Data analysis

In the weight and length plots, each datapoint represents the mean \pm standard error of the mean (SEM) of 20-100 fish. In the aromatase activity plots, at each sampling age, each datapoint is the mean \pm SEM of $n = 10$ determinations carried out in triplicate. Because of the small size of samples and the impossibility of dissecting brains and gonads of small larvae, at 56 DPH each determination was made by pooling three heads or three tails, to estimate brain and gonadal activity, respectively; at 98 DPH each determination was made by pooling either two heads or two tails; and at 150 DPH and onwards, each determination was either one dissected brain or one dissected gonad. The comparisons between control, S and L groups for growth were analyzed by ANOVA to determine if there were significant differences (Sokal and Rohlf, 1981). In the sampling at 298 DPH, the sex ratios were compared by a test of Chi-square to compare S and L with respect to the control.

Results

The application of four successive gradings based on size resulted in the generation of a group of progressively larger fish (L, LL, LLL, LLLL), a group of progressively smaller fish (S, SS, SSS, SSSS), as well as an ungraded control group. After 224 DPH the LLLL and the SSSS were referred to as the L-extreme and S-extreme groups, respectively (Fig. 29).

The evolution of length and weight of the sea bass leading to and of the L- and S-extreme groups is represented in Fig. 30 and 31, respectively. Significant ($P < 0.001$) differences in length and weight between, on one hand, large fish and, on the other, control and small fish, were already apparent as early as 66 DPH. The control and the small group were not

statistically different during most of the experiment. However, from 248 to 298 DPH the three groups were statistically different ($P < 0.001$), being largest the fish in the L-extreme group, followed by the ones in the control and the S-groups (Fig. 30).

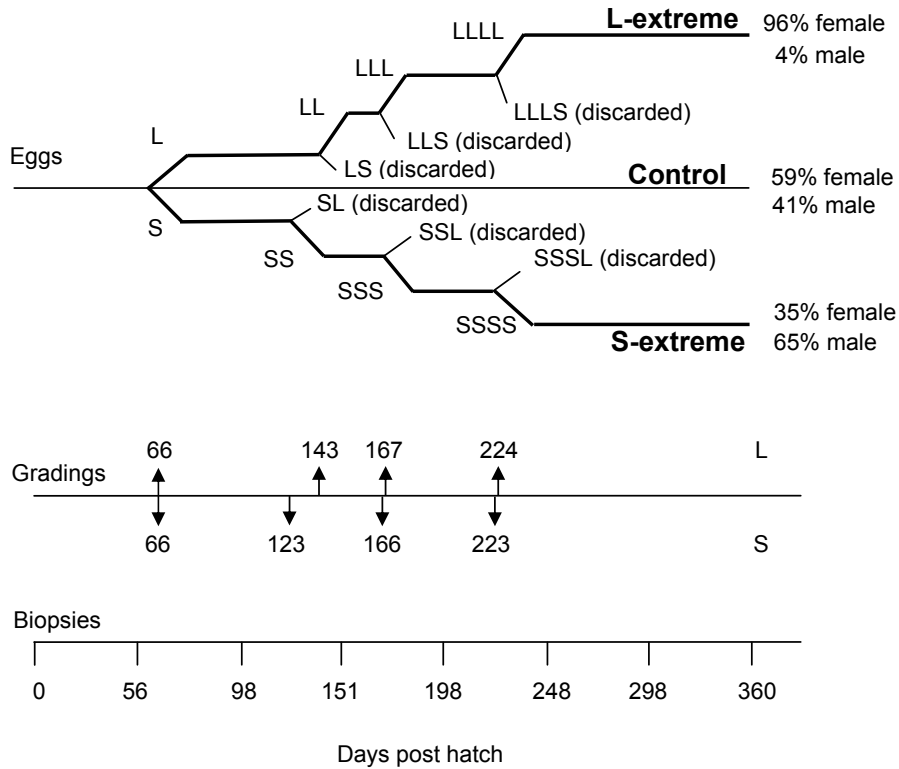


Figure 29. Protocol followed to produce male- or female-dominant groups of sea bass based on repeated gradings according to size and separation of large (L) and small (S) fish. Both S-extreme and L-extreme groups were obtained by gradings at the age in days posthatch (DPH) indicated by numbers (lower and upper arrows in the upper line, respectively) and tissues were sampled also at the ages indicated (thick marks in the lower line) to measure aromatase activity both in the brain and the gonads. Resulting sex ratios were histologically determined at 298 DPH.

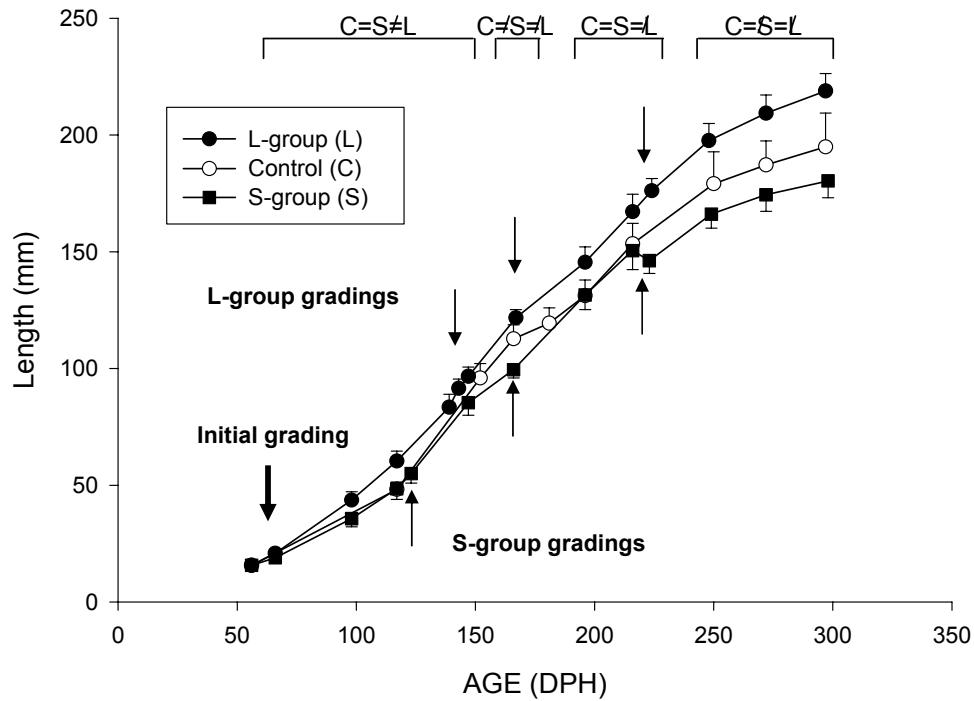


Figure 30. Evolution of length of sea bass belonging to the three groups: S- and L-extreme and control groups, during the first year of life (to 298 days post-hatch [DPH]). The arrows indicate the successive grading dates of the S and L groups. Data are expressed as mean \pm SEM of $n = 20-100$ fish per group at each sampling age. Significant differences between groups were determined by ANOVA ($P < 0.001$).

At the end of the experiment, at 298 DPH, the mean length of the L-extreme, control and S-extreme groups was 218.8 ± 7.5 , 194.9 ± 14.5 and 180.3 ± 7.2 mm, respectively.

Similar results were obtained in the analysis of weight (Fig. 31). Likewise, the mean weight of the L-extreme, control and S-extreme groups was 130.9 ± 17.6 , 91.1 ± 22.2 , and 66.6 ± 9.3 g, respectively. In both instances strong ($P < 0.001$) significant differences were observed between the three groups. Within each group, females had significantly larger size than males ($P < 0.001$).

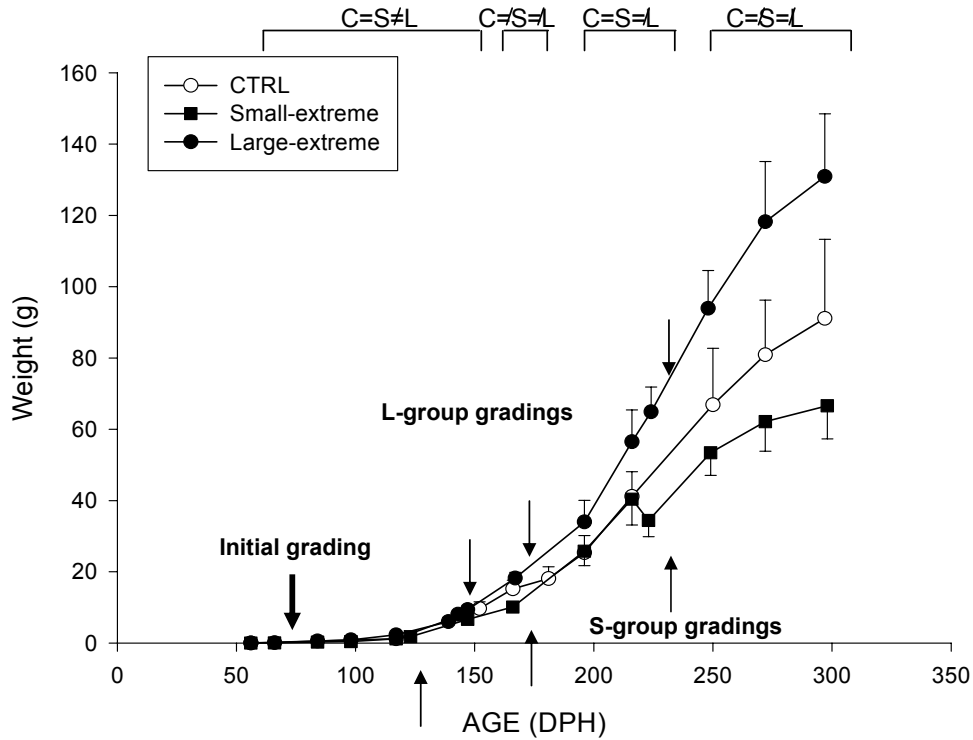


Figure 31. Evolution of weight of sea bass belonging to the three groups: S- and L-extreme and control groups, during the first year of life (to 298 days post-hatch [DPH]). The arrows indicate the successive grading dates of the S and L groups. Data are expressed as mean \pm SEM of $n = 20-100$ fish per group at each sampling age. Significant differences between groups were determined by ANOVA ($P < 0.001$).

In the sampling at 298 DPH, the overall female vs. male growth advantage was 37% for wet weight. Within males, spermiating fish were the largest, followed by fish containing spermatozoa, while the immature males were the smallest (Table 2).

Table 3. Summarized results on the groups produced by size grading. (A) The sex ratio of the populations and the percent males at different stage of testicular maturation as a function of all the fish in the population. (B) The % of reproductively mature fish in the S-extreme, Control and L-extreme groups. (C) The % of males at different stage of testicular maturation as a function of the male fish in the population

		S-extreme	Control	L-extreme
A Percent of all fish in group				
	Females			
	immature	35.4	59.1	96.0
	Males			
	Immature	36.4	8.0	0.0
	Intratesticular sperm	23.4	18.2	2.0
	spermiating	5.0	14.8	2.0
B Percent Reproductively mature				
	Females	0.0	0.0	0.0
	Males	43.8	80.6	100
C Percent of male fish in group				
	Immature	56.2	19.4	0.0
	Intratesticular sperm	36	44.5	50.0
	spermiating	7.8	36.1	50.0

The phenotypic sex could be histologically determined as early as 143 DPH (~90 mm). Based on histological analysis, the L-group already presented 91.1% females after the grading at 143 DPH. The grading protocol based on size to obtain male- or female-

dominant groups resulted in a 35.4% and 96.0% females in the S- and L-extreme groups, respectively, compared with 59.1% females in the control group (Fig. 29).

Thus, the grading protocol resulted in that in the L group, as early as 143 DPH, most of the fish (91.1%) were females, and that this condition was maintained throughout the rest of the experiment at 298 DPH (96% females). In contrast, in the S group 65% of the fish were males by 298 DPH. These findings must be kept in mind when analyzing the data concerning aromatase activity in brain and gonads between the L and S groups. Within the males, 100, 80.6, and 43.8% were mature (defined as either producing expressible milt or having intra-testicular milt) in the L-extreme, control and S-extreme groups, respectively (Table 2). In contrast, no mature females were found and their gonads only contained primary oocytes. Since all females were in the same immature state, their gonadosomatic index ($GSI = [\text{gonad weight}/\text{body weight}] * 100$) showed very little variation in the study (Fig. 32). On the other hand, the GSI varied significantly among males reflecting different stages of gonadal maturation. Since in captive sea bass sexual maturity usually occurs at the second year of life, these figures represent, in fact, the percent precociously mature males. The GSI of spermiating males was significantly higher ($P < 0.05$) than that of males with intratesticular spermatozoa, mature males and females (Fig. 32).

The ontogeny of aromatase activity of the L and S groups is shown in Fig. 33 (brain) and Fig. 34 (gonad). Regarding brain aromatase activity, no significant differences were detected between the L and S groups throughout the first year of life, although in the period between 150-200 DPH, i.e., the period leading to the first observable signs of sex differentiation, aromatase activity was higher in the L group than in the S group. Overall, brain aromatase activity rapidly increased between 98 and 198 DPH from basal levels to ~300 fmol/mg prot/h, remained at ~225 fmol/mg prot/h until 248 DPH, and rapidly increased ~2.5-fold to ~600 fmol/mg prot/h by 298 DPH (Fig. 33).

Figure 32. Gonadosomatic index (GSI) according to stage of gonadal maturity, in female (F) and male (M) sea bass (N in parentheses) from the two extreme and control groups at 298 days post-hatching. Different letter superscripts indicated significant differences (ANOVA, $P < 0.05$). IT sperm = intratesticular sperm.

In contrast to the situation with brain aromatase activity, gonadal aromatase activity was clearly different between the L and S groups (Fig. 34). Differences were statistically

significant as early as 98 DPH in favor of the L-group (64.5 fmol/mg prot/h and 8.3 for small group). Thus, differences in aromatase activity precede the earliest signs of sex differentiation in sea bass (which were first observed at 143 DPH, as indicated earlier). The highest increase in aromatase activity was observed between 151 and 248 DPH. By 198 DPH aromatase activity in gonads of the L- group was clearly higher than in the S-group (783.3 ± 164.8 vs 293.1 ± 113.56 fmol/mg protein/h; $P < 0.05$). The highest gonadal aromatase activity observed in the study was recorded in the L-group at 248 DPH. After that, it decreased slightly without significant changes in the L group. In sharp contrast, aromatase activity was reduced to non-detectable levels in the S group (Fig. 34).

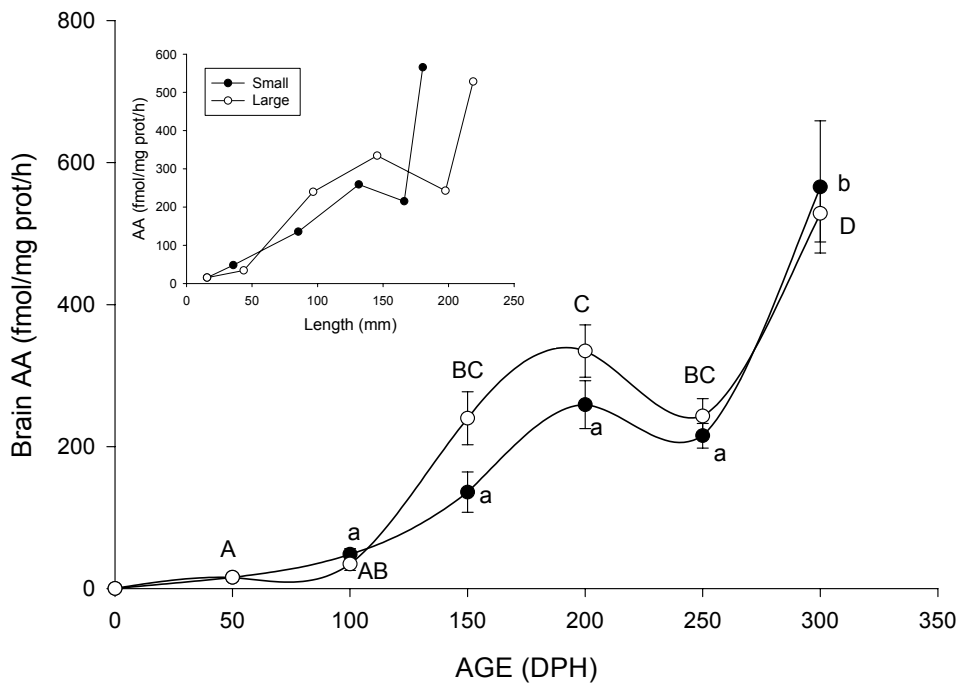


Figure 33. Ontogeny of sea bass brain aromatase activity (AA) during the first year of life in the S- and L-groups. Each datapoint is the mean of ten determinations, each carried out in triplicate. At 50 days post-hatch (DPH) each determination was made by pooling three heads or three tails; at 98 DPH each determination was made by pooling either two heads or two tails; and at 150 DPH and onwards, each determination was either one brain or one gonad. The insert plot represents length vs. AA. Different letters indicate statistical differences between different ages ($P < 0.001$) within each group. Capital letters for the L-group and lower-case letters for the S-group.

Essentially, the results on the ontogeny of brain and gonadal aromatase activity in the S- and L-groups were the same when data was expressed according to actual fish length instead of age (Figs 33 and 34, inserts). In fact, differences in aromatase activity between the S- and L-group were still evident even after correcting for size differences, indicating that other factors (most probably sex) may be responsible for these differences.

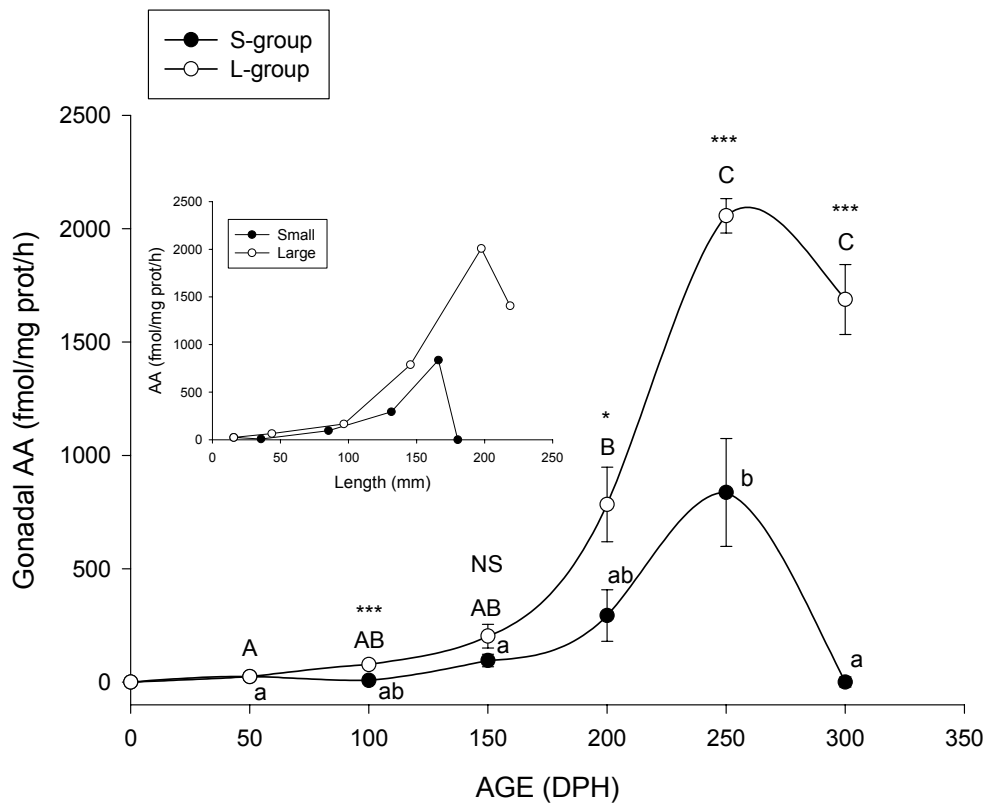


Figure 34. Ontogeny of sea bass gonadal aromatase activity during the first year of life in the S- and L-groups. Each datapoint is the mean of ten determinations, each carried out in triplicate. At 50 days post-hatch (DPH) each determination was made by pooling three heads or three tails; at 98 DPH each determination was made by pooling either two heads or two tails; and at 150 DPH and onwards, each determination was either one brain or one gonad. The insert represents length vs. AA. Different letters indicate statistical differences between different ages ($P < 0.001$) within each group. Capital letters for the L-group and lower-case letters for the S-group.

Discussion

This study confirms that sea bass females grow more than males and that differences are already evident during the first year of life (Carrillo et al., 1995), with a difference of 37% at 298 DPH. Considering that this advantage continues until sea bass reaches commercial size, it could benefit the aquaculture industry, because a group of female-dominant fish would reach the commercial size in less time. Discarding a group of slow growing sea bass early in development (56 - 98 DPH when it was found that already 91% of the fast growing group were females) would not result in significant losses and it would be overcompensated with the benefits of maintaining a group of fast growing fish. Another advantage demonstrated in this work was that females did not sexually mature before the commercial size. However, males were reproductively mature during the first year of life, diverting energy from muscle growth to gonadal development and sperm production. Probably for that reason, in this study it was found that at 298 DPH males were smaller than females, because 80% of males had already reproductively matured.

The increase of aromatase activity in gonads at 248 DPH coincided with the time when the sex differentiation is finished in the sea bass (Blázquez *et al.*, 1995), and the highest aromatase activity level in females than in males would mean a higher need of estradiol production for specific ovarian development. This would also be explained by the decrease of the gonadal aromatase activity in the small group (at least 65% males) at 298 DPH, perhaps due for the non-requirement of estrogens to complete testis development.

Taken together, these results suggest that the pattern of aromatase activity in males and females is similar during the period leading to sex differentiation, and aromatase activity would be required for gonadal development regardless of phenotypic sex. After that, the requirement of estradiol in females could result in an increase of aromatase activity and a maintenance of high levels during more time to complete ovarian development while male development could proceed without the need for estrogen synthesis. Interestingly, the maximum values of gonadal aromatase activity in the L-group at 248 DPH were of the same magnitude as those found in adults during the spawning season (González y Piferrer, 2003), which means that a considerable amount of aromatase activity is needed for estrogen-mediated processes during the first year of life. It is noteworthy, however, that presumed males (of the S-group) did not show neural aromatase activity levels as high as those of females, while adult male sea bass has higher values than females. The same was observed with the presence of GnRH in sea bass juveniles (of nine months of age) that showed higher levels than in adults (Rodríguez et al., 2000).

Studies on the ontogeny of factors that can be implicated in the process of sex differentiation during the first months of life in the sea bass are scarce. One of the first studies concerning the histology of the different gonadal development stages: appearance of PGC (primordial germ cells), development of the gonadal primordium, organization of the undifferentiated gonad and testicular or ovarian development, was performed in larvae and juveniles of sea bass under culture conditions, showing that the ovarian and testicular differentiation happened in fish of 11-23 months of age and from 90 to 187 mm SL (standard length) (Roblin and Bruslé, 1983). Later experiments showed that sex differentiation happened earlier than 9 months of age. It was also demonstrated that the sex ratio can be manipulated depending of the water temperature at which the fishes are cultured during the termosensible period (Blázquez *et al.*, 1998; Pavlidis *et al.*, 2001; Koumoundouros *et al.*, 2002). Concerning the pattern of sexually-related differences in

aromatase activity in the sea bass, it was earlier demonstrated that in adults both in brain homogenates and in different brain areas, aromatase activity was higher in males than in females during the spawning season (González and Piferrer, 2002). Some recent studies have found two different catalytic activities in brain and ovary (Trant, 1994; Zhao *et al.*, 2001; González and Piferrer, 2002) and two different isoforms of the aromatase gene have been cloned, one for the brain (CYP19b) and another for the ovary (CYP19a) in different species of teleosts (Kishida and Callard, 2001; Kwon *et al.*, 2001). In relation to the different expression of both genes there are two studies on the ontogeny of the CYP19 gene expression, one in tilapia nilotica, *Oreochromis niloticus* (Kwon *et al.*, 2001) and another in zebra fish, *Danio rerio* (Trant *et al.*, 2001). In the case of tilapia, the brain aromatase expressed similar levels in both sexes as it happened with the sea bass aromatase activity. However, in gonads both sexes expressed similar ovarian aromatase levels until 11 DPF when the labile period starts in this species, after this age females increased its expression but males decreased the next 15 days to recover at 27 DPF the highest expression levels, when sex differentiation started. With respect to the pattern of the zebra fish, the highest levels of expression of the two genes (CYP19a and CYP19b) were detected immediately after hatching. In general, CYP19a was more abundantly expressed than CYP19b, but the latter could be segregated into two populations, suggesting an association with sex differentiation (Trant *et al.*, 2001). There is also evidence that the two isoforms of aromatase gene recently cloned in brain and ovary of sea bass have a high percent of homology with the tilapia sequences, the same situation that in the sex differentiation pattern of aromatase. This indicates a close relation between sea bass and tilapia with regard to the pattern of the aromatase role during sex differentiation.

Based on the expression pattern of aromatase gene in tilapia, Kwon *et al.*, (2001) suggested that the primary aromatization site was the brain rather than gonad. The results of this work showed that aromatase activity started to increase 50 days before in the brain

than in the gonad. This suggests that events related to sex differentiation could start in brain and not in the gonad, as it was traditionally thought. Further research is certainly warranted in this area, especially taking into account that the sea bass is a gonochoristic species where, in contrast to the situation with hermaphroditic species, it was not thought that the brain would be implicated in early sex differentiation.

Acknowledgments

This work was supported by EU grant Q5RS-2000-31365 to F.P. and C.M. A.G. was supported by a doctoral fellowship from the Ministry of Science and Technology, Spain. The authors also wish to thank the other partners in this project, whose collaboration was essential to obtain the considerable number of samples processed.

References

- Baroiller JF, Chourrout D, Fostier A, Jalabert B. 1995. Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.* 273:216-233.
- Baroiller JF, Guiguen Y, Fostier A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell Mol. Life Sci.* 55:910-931.
- Blázquez M, Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, Donaldson EM. 1995. Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 α -methyltestosterone prior to sex differentiation. *Aquaculture.* 135:329-342.

Blázquez M, Zanuy S, Carrillo M, Piferrer F. 1998. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). J. Exp. Zool. 281:207-216.

Blázquez, M., M. Carrillo, Zanuy, S. Piferrer, F. 1999. Sex ratios in offspring of sex-reversed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and the relationship between growth and phenotypic sex differentiation. J. Fish Biol. 55: 916-930.

Bogart MH. 1987. Sex determination: a hypothesis based on steroid ratios. J. Theory Biol. 128:349-357.

D'cotta H, Fostier A, Guiguen Y, Govoroun M, Baroiller JF. 2001. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. Mol. Reprod. Dev. 59:265-276.

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

Francis RC. 1992. Sexual lability in teleosts: Developmental factors. Q. Rev. Biol. 67:1-18.

González A, Piferrer F. 2002. Characterization of aromatase activity in the sea bass. Effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. J. Exp. Zool. 293: 500-510.

González A, Piferrer F. 2003. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. Gen. Comp. Endocrinol. (In press).

Guiguen Y, Baroiller JF, Ricordel MJ, Iseki K, McMeel OM, Martin SA, 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.

Guiguen Y, Govoroun M, D'Cotta H, McMeel OM, Fostier A. 2000. Steroids and gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E., Stefansson, S.O., editors. Proceedings of the sixth international symposium on the reproductive physiology of fish. Bergen, Norway. pp. 241-243.

Kishida M, Callard GV. 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in Zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. Endocrinology. 142:740-750.

Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, Abe SI. 2000. Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Mol. Reprod. Dev. 56:1-5.

Koumoundouros G, Pavlidis M, Anezaki L, Kokkari C, Sterioti A, Divanach P, Kentouri M. 2002. Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*

(L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase. J. Exp. Zool. 292:573-579.

Kwon JY, Haghpanah V, Kogson-Hurtado LM, McAndrew BJ, Penman DJ. 2000. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. J. Exp. Zool. 287:46-53.

Kwon JY, McAndrew BJ, Penman DJ. 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Mol. Reprod. Dev. 59:359-370.

Liu S, Govoroun M, D'Cotta H, Ricordel MJ, Lareyre JJ, McMeel OM, Smith T, Nagahama Y, Guiguen Y. 2001. Expression of cytochrome P45011 $\alpha\beta$ (11 $\alpha\beta$ -hydroxylase) gene during gonadal sex differentiation and spermatogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 75:291-298.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein determination with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

Nakamura M, Kobayashi T, Chang X, Nagahama Y. 1998. Gonadal sex differentiation in teleost fish. J. Exp. Zool. 281:362-372.

Pavlidis M, Koumoundouros G, Sterioti A, Somarakis S, Divanach P, Kentouri M. 2000. Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). J. Exp. Zool. 287:225-232.

Piferrer, F., 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197: 229-281.

Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, Solar I, Devlin R, Donaldson E. 1994. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *J. Exp. Zool.* 270:255-262.

Roblin C, Bruslé J. 1983. Ontogenèse gonadique et différenciation sexuelle du loup *Dicentrarchus Labrax*, en conditions d'élevage. *Reprod. Nutr. Dévelop.* 23:115-127.

Rodríguez L, Carrillo M, Sorbera LA, Soubrier MA, Mañanós E, Holland MC, Zohar Y, Zanuy S. 2000. Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. *Gen. Comp. Endocrinology.* 120:67-74.

Saillant E, Fostier A, Haffray P, Menu B, Thimonier J, Chatain B. 2002. Temperature effects and genotype-temperature interactions on sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Exp. Zool.* 292:494-505.

Sokal RR, Rohlf FJ. 1981. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research* (2^a Ed.) New York, W.H. Freeman y Co. p 859.

Trant JM. 1994. Isolation and characterization of the cDNA encoding the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) form of cytochrome P450arom. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95:155-168.

Trant JM, Gavasso S, Ackers J, Chung BC, Place AR. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in Zebrafish fry (*Danio rerio*). J. Exp. Zool. 290:475-483.

Yamamoto T. 1953. Artificially induced sex reversal in genotypic males of the medaka *Oryzias latipes*. J. Exp. Zool. 123:571-594.

Yamamoto T. 1969. Sex differentiation. Fish Physiol. W. S. Hoar and D. J. Randall. New York, Academic Press. 3 Reproduction, pp. 117-175.

Zhao J, Mak P, Tchoudakova A, Callard G, Chen S. 2001. Different catalytic properties and inhibitor responses of the goldfish brain and ovary aromatase isozymes. Gen. Comp. Endocrinol. 123:180-191.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN GENERAL

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN GENERAL

En esta sección, una vez se tiene la visión general de la memoria, se amplían algunos aspectos ya discutidos en los capítulos precedentes y además se introducen algunos nuevos, resultado también de los datos disponibles o de experimentos adicionales.

Dos isoformas diferentes en cerebro y ovario

Al comenzar esta investigación sólo existían algunos estudios sobre las propiedades catalíticas (V_{\max} y K_m) de la aromatasa de peces (Pasmanik y Callard, 1985; Timmers y Lambert, 1987; Antonopoulou et al., 1995). Por tanto, se determinó la V_{\max} y K_m de este enzima del cerebro y ovario de la lubina, cuyos resultados fueron presentados en el capítulo II. Sin embargo, desde el inicio de este trabajo se ha descubierto la existencia de dos isoformas de P450 aromatasa, una en cerebro y otra en ovario, en varias especies de teleósteos tales como la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (Chang et al., 1997; Kwon et al., 2001), la carpa dorada, *Carassius auratus* (Tchoudakova y Callard, 1998), la tilapia de Mozambique, *Oreochromis mossambicus* (Cruz y Canario, 2000) y el pez cebra, *Danio rerio* (Kishida y Callard, 2001). Respecto a las propiedades catalíticas del enzima, sólo la V_{\max} había sido comparada entre el cerebro y la gónada en la carpa dorada (Pasmanik y Callard, 1985), obteniéndose resultados similares a los encontrados en este trabajo, es decir, valores más altos en cerebro que en gónada. Sólo en experimentos recientes se han comparado las propiedades catalíticas de la actividad aromatasa en el cerebro y la gónada de la carpa dorada tras transfección de células COS (línea celular de riñón de mono) y CHO (Chinese hamster ovary) (Tchoudakova and Callard, 1998; Zhou et al., 2001). Sin embargo, en esta investigación, y en la ausencia inicial de sondas para las dos isoformas, se llevaron a cabo medidas de la actividad

aromatasa utilizando tejidos homogenados. El método por transfección, a pesar de presentar las ventajas de poder medir la actividad intrínseca de las diferentes formas del enzima proveniente de cada uno de los tejidos, requiere la comprobación de que la expresión de la proteína en las células que se transfectan está a niveles comparables (Zhou et al. 2001) porque de lo contrario la diferencia entre las V_{\max} de las dos isoformas podría ser determinada erróneamente. Del mismo modo, existe la desventaja de que las células COS expresan el gen de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Trant, 1994), enzima responsable de transformar la androstenediona (sustrato) en testosterona, pudiendo interferir en la medida de la actividad aromatasa por competencia por el mismo sustrato. Por otro lado, el método utilizado en esta investigación, simula mejor la situación *in vivo*, porque los tejidos homogenados crudos contienen la proteína nativa. Sin embargo, en estos experimentos *in vitro* pueden incluir las posibles diferencias de los tejidos analizados respecto a los niveles de transcripción. Además, en este último método, y en el caso particular de la aromatasa, se debe tener en cuenta los posibles cambios en la cantidad de NADPH citocromo reductasa en el medio celular.

Debido a la reciente clonación de las dos formas del gen de la aromatasa: ovario (Dala Valle et al., 2001) y cerebro (Blázquez y Piferrer, datos no publicados), en estos momentos estamos en la posición de poder afirmar que la propuesta de la existencia de dos isoformas, basada en el hallazgo de dos actividades catalíticas diferentes en cerebro y ovario de lubina discutido en el Capítulo II, es cierta. Sin embargo, se debería comprobar si las diferentes propiedades catalíticas encontradas usando preparaciones de homogenados crudos, siguen siendo aparentes tras la transfección de células COS con la isoforma del cerebro o del ovario, y posterior medida de la actividad aromatasa tras incubación con un sustrato adecuado.

De hecho, la existencia de dos isoformas del gen de la aromatasa está bastante conservada en teleósteos. El porcentaje de homología de las diferentes isoformas entre la

lubina y las tilapias del Nilo y de Mozambique es muy superior al encontrado cuando se comparan las secuencias correspondientes con las del resto de especies disponibles (Blázquez y Piferrer, en preparación). Aquí es interesante reseñar que, como se verá en el apartado de “Diferencias en actividad aromatasa durante el desarrollo. Aromatasa y diferenciación sexual”, estas especies también presentan similares patrones de ontogenia de la actividad aromatasa.

Diferencias en actividad aromatasa entre cerebros de machos y hembras

La capacidad de transformar andrógenos en estrógenos es una característica ancestral del cerebro de los vertebrados. La actividad aromatasa se localiza principalmente en las áreas anteriores del cerebro de teleósteos incluyendo bulbo olfatorio, telencéfalo e hipotálamo (Callard et al., 1988). Por el contrario, en las áreas media (bulbo óptico) y posteriores (médula y cerebelo) esta actividad no es nula, pero los niveles son considerablemente más bajos (Pasmanik y Callard, 1985). Asimismo, niveles altos se pueden observar también en la hipófisis (Callard et al., 1981). Por tanto, los resultados obtenidos en la lubina y presentados en el capítulo III, concuerdan con los encontrados anteriormente en teleósteos (Pasmanik y Callard, 1988b).

En el transcurso de esta investigación, también se demostraron diferencias relacionadas con el sexo, con una mayor actividad en machos que en hembras en contra de lo que había sido anteriormente observado en los pocos estudios que había al respecto (D’Cotta *et al.*, 2001). En este sentido, sería lógico pensar que ello es debido a que los machos poseen mayores niveles plasmáticos medios de andrógenos (como sustrato de la aromatasa) que las hembras. En realidad, los niveles plasmáticos de testosterona en la lubina son mayores en hembras (8 ng/ml en enero y 10 ng/ml en mayo) que en machos (2,7 ng/ml en enero y 5,5 ng/ml en mayo) (Prat *et al.*, 1990), lo que invalida el anterior

argumento. Sin embargo, al analizar la concentración de T plasmática en las diferentes ovulaciones de una hembra, sólo en la primera ovulación en diciembre, presenta niveles de 7 ng/ml, mientras que en las posteriores ovulaciones (enero-febrero) los niveles oscilan entre 2 y 3 ng/ml (Asturiano et al., 1997). Otra explicación posible para una mayor actividad aromatasa en machos que en hembras, tomaría en cuenta que en cautividad los machos de lubina maduran sexualmente a los dos años, mientras que las hembras no lo hacen hasta los tres, y para los experimentos realizados en el Capítulo III se utilizaron peces de dos años de edad procedentes de instalaciones de engorde de lubina, en donde no se mantienen peces más allá de los 24 meses. Por ello, para evitar una posible diferencia debida al grado de madurez sexual, probablemente hubiese sido más apropiado comparar los niveles de actividad aromatasa en el tercer año de edad, donde tanto machos como hembras se encontrarían maduros sexualmente. Ello no fue posible debido a la dependencia del suministro de peces originarios de plantas de engorde.

Por otro lado, se sabe que la parte anterior del cerebro está implicada en el control de la reproducción (Callard et al., 1993). En consecuencia, sería interesante medir la actividad aromatasa en las diferentes partes del cerebro a lo largo del año y comprobar si existen cambios relativos de actividad en relación con el ciclo anual. Finalmente, quedaría por entender la función de los neuroestrógenos en el cerebro, como se plantea en la introducción de esta memoria, ya que el neuroestrógeno sintetizado puede tener una función paracrina o autocrina y no endocrina (Callard et al., 1995). Asimismo, cabría determinar definitivamente si el cerebro o las gónadas son el primer sitio de aromatización tal y como se discute en el apartado “Diferencias en actividad aromatasa durante el desarrollo. Aromatasa y diferenciación sexual”.

Distribución de la actividad aromatasa

Las primeras investigaciones sobre la distribución anatómica de la actividad aromatasa en vertebrados no mamíferos tuvieron que ser necesariamente muy cautelosas respecto a comprobar la autenticidad de la actividad encontrada. Los estudios llevados a cabo hasta mediados de los setenta se realizaban en mamíferos y el tejido con mayor actividad aromatasa hasta el momento era la placenta humana (Siiteri y Thompson, 1975). Por tanto, el descubrimiento de altos niveles de esta actividad en el cerebro de un reptil fue sorprendente. Sin embargo, el empleo de la técnica de recristalización del producto a actividad específica constante confirmó la síntesis de estrógenos en el cerebro de *Chrysemys picta* (Callard et al., 1977). Del mismo modo, se detectó que la actividad aromatasa por unidad de proteína en la carpa dorada era del orden de cien a mil veces superior que la encontrada hasta entonces en mamíferos y, además, en sitios inesperados como la retina (Callard et al., 1993).

En la lubina, se ha detectado por el método del agua tritiada actividad aromatasa en el hígado, la grasa visceral y el riñón anterior, además de en el cerebro y el ovario, como cabía esperar (Capítulo III). La presencia de actividad aromatasa en la grasa visceral es muy común en mamíferos (Martel et al., 1994; Cohen, 2001), pero no se había detectado hasta ahora en ningún vertebrado inferior. En los últimos años, se ha probado que existe esteroidogénesis en hígado tanto en ratas maduras (González, et al., 1992) como en inmaduras (Katagiri, et al., 1998), donde existe gran abundancia de P450 como P450c17 y P450c19.

En peces, debido a la ausencia de glándula suprarrenal (como productor principal de corticosteroides), el riñón anterior es un órgano con capacidad esteroidogénica (Young, 1986) y por tanto no es extraño encontrar actividad aromatasa en dicho órgano. Queda descartada, en un principio, la posibilidad de que se estuviese midiendo pseudoaromatasa

como ocurría en linfocitos humanos (Berstein, et al., 1993), debido a que el método ha sido optimizado y validado para esta especie y los valores obtenidos triplicaron, como mínimo, el valor del control de sustrato. En el resto de tejidos analizados, los niveles de actividad aromatasa no fueron significativamente diferentes a los del control sustrato, y en el caso del testículo es lógico pensar que esa baja actividad provoca los bajos o nulos niveles plasmáticos de estradiol observados en machos. A pesar de todas estas consideraciones, estos resultados aún han de ser tomados con cautela debido a que, como se menciona al principio de este apartado, el método utilizado debería ser revalidado con una prueba adicional, tal como la recristalización a actividad específica constante, para así poder confirmar la equivalencia entre las hidroxilaciones (método de agua tritiada) y autenticidad de la identidad del estrógeno (recristalización).

Inhibición endógena

Aunque los esteroides sexuales juegan, en general, un papel importante en la diferenciación sexual, parece existir últimamente una tendencia a clasificar los teleósteos en dos grupos: aquellos cuya diferenciación sexual es dependiente de esteroides sexuales y los que cuya diferenciación sexual sólo depende de factores genéticos (Y. Nagahama, comunicación personal). En este sentido, estudios recientes en medaka (*Oryzias latipes*) han demostrado la existencia de un gen, *DMY*, probablemente determinante del sexo (Matsuda et al., 2002) al igual como el *Sry* determina el sexo masculino en humanos (Sinclair et al., 1990). De forma similar, en trucha arco iris, el gen *DMRT* parece jugar un papel importante en la diferenciación masculina (Marchand et al., 2000). Se sabe que la aromatasa y los estrógenos juegan un papel importante en la diferenciación ovárica (Guiguen *et al.*, 1999). Respecto a la diferenciación testicular, en los últimos años se atribuye un rol importante a los 11 β -hidroxiandrógenos y no a la testosterona, como se pensaba hasta entonces (Guiguen *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001), debido a que estos 11 β -

andrógenos son producidos específicamente en testículos, especialmente durante la diferenciación sexual, en la carpa común (Komen et al., 1985), en el pez gato africano (Van den Hurk et al., 1989) y en la tilapia del Nilo (Baroiller et al., 1998).

Teniendo en cuenta esta nueva posición de los 11β -andrógenos, se analizó el efecto que podrían estar ejerciendo sobre la actividad aromatasa del cerebro y del ovario de la lubina. Anteriormente, sólo se había identificado la 5β -dihidrotestosterona como un inhibidor endógeno de la aromatasa, que podría estar regulando la diferenciación sexual de la paloma, *Streptopelia risoria* (Schumacher et al., 1991), no existiendo otra información disponible en vertebrados y, por supuesto, ninguna en peces. Los resultados obtenidos in vitro en la lubina indican que la 11β -hidroxiandrostenediona pero no la 11β -hidroxitestosterona era capaz de inhibir la actividad aromatasa del cerebro y del ovario. La caracterización de esta inhibición incluyó la producción de 11β -hidroxiandrostenediona, su especificidad, reversibilidad y capacidad de inhibición tal y como se ha discutido en el capítulo IV.

Sin embargo, para caracterizar mejor esta inhibición, se realizaron estudios preliminares in vivo (Fig. 35). Para ello fue necesario primero estimular la actividad aromatasa debido a que los experimentos coincidieron con el verano, cuando los niveles son bajos. En gónadas diferenciadas de mújol (*Mugil cephalus*) y medaka, la actividad aromatasa se incrementa con tratamientos de estradiol (Chang et al., 1999; Scholz y Gutzeit, 2000), mientras que en el testículo de la trucha arco iris el estradiol no indujo el mRNA de la aromatasa y reprimió los mRNAs de otros enzimas esteroideogénicos (e.g. 11β -hidroxilasa) asociados al desarrollo testicular (Govoroun et al., 2001). Estos datos implican que los esteroides exógenos actúan, en parte, alterando la expresión de los genes de enzimas esteroideogénicos implicados en la diferenciación sexual. Para llevar a cabo los experimentos in vivo, se realizaron previa anestesia inyecciones de estradiol (E_2) (5 mg/Kg) y metiltestosterona (MT) (5 mg/Kg) en la cavidad abdominal. Tras un periodo de

72 h, se midió la actividad aromatasas de cerebro, comparándola con la de peces sin tratamiento, observándose un aumento en los peces tratados con estradiol (Fig. 35A) pero no con MT. Seguidamente, se determinó el tiempo necesario tras la inyección con E₂ para conseguir la mayor estimulación posible. Los resultados mostraron que tras 96 h la estimulación de la actividad aromatasas no aumentaba más que a las 72 h (Fig. 35B). Para decidir la concentración de inhibidores a utilizar se realizaron estudios previos con diferentes concentraciones de CGS 16949A, como control positivo de inhibición de la aromatasas, y 11βOHΔ⁴ (datos no mostrados) y se determinó que el rango debía ser de unos pocos microgramos.

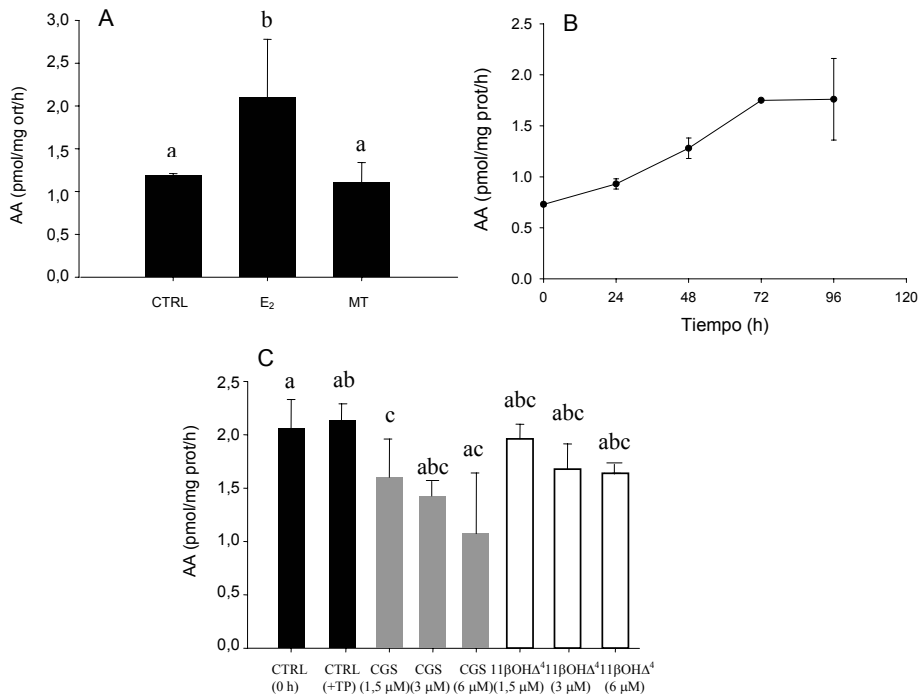


Fig. 35. Experimentos in vivo para verificar los resultados in vitro sobre el efecto de la 11βOHΔ⁴ sobre la actividad aromatasas de la lubina. A) Experimento previo para determinar si el estradiol (E₂) o la metiltestosterona (MT) estimulan la actividad aromatasas (AA). CTRL = control inyectados con tampón salino (TP). B) Efecto del E₂ inyectado en función del tiempo. C) Efecto de diferentes concentraciones de CGS 16949A y 11βOHΔ⁴ (1,5-3-6 μM). Las diferentes letras indican diferencias significativas (P < 0,05).

Una vez decididas las concentraciones y tiempos adecuados, se usó un nuevo lote de peces que se trató con E₂ (5 mg/Kg) y pasadas 96 h, se volvieron a anestésiar para estudiar los efectos del CGS 16949A y 11βOHΔ⁴ inyectando (con una aguja Hamilton) diferentes concentraciones (1,5-3-6 μM) en el cerebro. Pruebas previas se llevaron a cabo inyectando azul de metileno en cerebros de peces muertos para saber exactamente dónde realizar la inyección. Los resultados del efecto del CGS 16949A y 11βOHΔ⁴ 48 h después de la inyección en el cerebro, mostraron una clara tendencia a inhibir de manera dosis-dependiente la actividad aromatasa *in vivo*, aunque en menor medida lo que se había observado *in vitro* (Fig. 35C).

Se intentó encontrar diferencias relativas a la época del año pero la inhibición por 11βOHΔ⁴ en cerebro fue similar tanto al principio de la época de puesta (noviembre) como al final (marzo). Aunque los experimentos *in vitro* de caracterización del inhibidor fueron realizados en peces adultos, sería también interesante estudiar el papel que podrían jugar estos andrógenos como reguladores de la diferenciación sexual, tal como ocurría en la paloma (Schumacher et al., 1991). La hipótesis sería que si la producción de los 11β-hidroxiandrógenos es exclusiva de la diferenciación sexual masculina, los 11β-hidroxiandrógenos podrían estar inhibiendo la actividad aromatasa, por ejemplo, tras la diferenciación sexual, cuando la síntesis de estrógenos es innecesaria en el desarrollo específico del testículo.

La figura 36 representa el modelo propuesto para el funcionamiento de la 11β-OHΔ⁴ en la ruta esteroidogénica. La 11βOHΔ⁴, al ser capaz de inhibir la actividad aromatasa, puede contribuir a su regulación reduciendo el efecto estrogénico provocado por el estrógeno al incidir sobre el enzima responsable de su síntesis y, por tanto, a potenciar relativamente los efectos androgénicos que produce el propio andrógeno unido a su receptor.

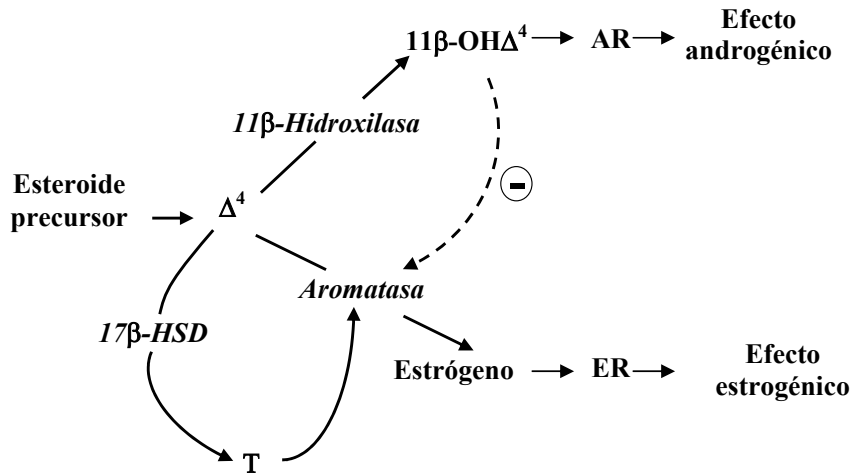


Fig. 36. Esquema del modelo propuesto para la doble acción de la 11β-hidroxiandrostenediona (11β-OHΔ⁴). Este andrógeno aumentaría su efecto androgénico relativo inhibiendo (-) la actividad aromatasa y, por tanto, la síntesis de estrógenos, responsables del efecto estrogénico. 17β-HSD = 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, Δ⁴ = Androstenediona, T = testosterona, AR y ER, receptor de andrógeno y estrógeno, respectivamente.

Existen observaciones acordes con el modelo propuesto. Así, tratamientos cortos con 11β-OHΔ⁴ en la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, impiden la expresión del gen de la aromatasa durante la diferenciación sexual (Govoroun et al., 2001). Tratamientos similares consiguieron masculinizar truchas arco iris sexualmente indiferenciadas, con un porcentaje de efectividad del 100% (Van den Hurk et al., 1989; Feist et al., 1995), al igual que ocurría en otras especies como la tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (Baroiller and Toguyeni, 1996), y la carpa común, *Cyprinus carpio* (Komen et al., 1995). Por tanto, es posible que los efectos masculinizantes, debidos a los 11β-andrógenos sean debidos, en parte, a un efecto inhibitor sobre la aromatasa tanto a nivel de su expresión (Govoroun et al., 2001) como de su actividad (parte de esta investigación).

Cabría preguntarse, además, si la $11\beta\text{-OH}\Delta^4$ es capaz también de inhibir la actividad aromatasa de tejidos en los que está sobreexpresada como, por ejemplo, en teoría, en los tumores cancerígenos estrógeno-dependientes. Con este fin, se realizaron pruebas para determinar el efecto de la $11\beta\text{-OH}\Delta^4$ sobre la actividad aromatasa en biopsias humanas de mama y próstata cancerígenos (amablemente donados por la Dra. Francina Munell). Se determinó la actividad aromatasa en tejidos sanos y tumorales tratados y no tratados con $11\beta\text{-OH}\Delta^4$. El protocolo utilizado fue el del método de agua tritiada optimizado en el cerebro de lubina (González y Piferrer, 2002), con la excepción del tiempo de homogenización, que fue ampliado a $5 \times 5''$, debido al alto contenido en grasa de los tejidos analizados. En ninguno de ellos fue posible detectar niveles significativos de actividad aromatasa, y por tanto no se pudieron probar los efectos del presunto inhibidor sobre un tejido donde la actividad aromatasa fue prácticamente nula aunque, en teoría, debía ser elevada, al menos en los tumores. Así pues, queda abierta una vía de investigación, a pesar de que los inhibidores sintéticos específicos y específicamente desarrollados para estos casos siempre serán más eficaces que cualquier inhibidor endógeno.

Efectos de la temperatura. Posibilidad de ESD en lubina mediada por actividad aromatasa

Los efectos de los factores ambientales en la diferenciación sexual han sido objeto de estudio en varias especies. Sin embargo, no todos los factores ambientales han sido analizados exhaustivamente. La temperatura ha sido el factor más estudiado (Baroiller et al., 1999; Devlin y Nagahama, 2002).

Descartado un simple modelo genético tras diferentes estudios sobre la lubina (Carrillo et al., 1993; Blázquez et al., 1999; Chatain et al., 2000), se le otorga a los factores ambientales una posible implicación en el sexo fenotípico. Así como el

tratamiento de esteroides exógenos estaba muy bien delimitado, la primera dificultad para estudiar el efecto de la temperatura, residía en determinar cuál era el periodo termosensible para poder aplicar un tratamiento a una u otra temperatura. Por ello, los resultados de los diferentes experimentos realizados en la lubina variaron dependiendo de cuando se aplicaron las distintas temperaturas probadas y de cuando empezaron los tratamientos, pero todos demostraron una implicación de la temperatura en la diferenciación sexual de la lubina (Blázquez et al., 1998; Pavlidis et al., 2000; Koumoundouros et al., 2002; Saillant et al., 2002). La temperatura no sólo estaría implicada en la diferenciación sexual sino que también influiría en el crecimiento del pez o afectaría de diferente manera en función del tamaño del animal (Saillant et al., 2002). Cuando el cultivo de las larvas se realizaba a 15°C entre 57 y 137 días post fertilización (DPF), coincidiendo con el periodo lábil a los esteroides sexuales exógenos, la masculinización era del 100% (Blázquez et al., 1998). Sin embargo temperaturas de 25°C no alteraron la proporción de sexos de la lubina encontrada típicamente en cultivo. El hecho de alargar o acortar un tratamiento con cambios de temperatura a lo largo del tratamiento, podría resultar favorecedor para un sexo u otro, así como comenzar antes el tratamiento. Por ejemplo, cuando los tratamientos con bajas temperaturas (13-15°C) se aplicaron desde estadios tan tempranos como la primera división del huevo hasta aproximadamente la mitad de la metamorfosis (~17-18 mm; ~52-60 días post eclosión (DPH)), se consiguió una feminización de 72-74% a 13°C y de 67-73% a 15°C. Por el contrario, temperaturas de 20°C resultaron en una masculinización de 72-76% (Pavlidis et al., 2000). Por otro lado, cultivos durante el mismo tiempo que los acabados de mencionar, con 15°C, 20°C, 15°C durante 7 días y luego 20°C ó 15°C durante 34 días y después 20°C, resultaron en un aumento en el porcentaje de hembras a medida que aumentaba el tiempo de exposición a la menor temperatura (15°C), desde un 18,1% al 66,1% (Koumoundouros et al., 2002). Recientemente, exposición a bajas temperaturas (13°C) de nuevo resultaron en un bajo porcentaje de hembras (11%) cuando los tratamientos se llevaron a cabo desde la fertilización hasta 860 DPF (14,1 cm de longitud

total) o cuando la temperatura fue de 13°C desde la fertilización hasta los 19 DPF aumentando a 20°C el resto del tratamiento, mientras que el grupo control a 20°C resultó en un 31% de hembras (Saillant et al., 2002).

Con anterioridad a este trabajo, a pesar del papel demostrado de la aromatasa en la diferenciación sexual, no existían trabajos sobre el efecto de la temperatura sobre la expresión del gen de la aromatasa ni sobre la actividad enzimática. Con la información y las herramientas disponibles ahora, sería interesante estudiar si el efecto de la temperatura sobre la proporción de sexos viene mediada a través del enzima aromatasa.

Diferencias en la actividad aromatasa durante el desarrollo. Aromatasa y diferenciación sexual

Puesto que el método del agua tritiada optimizado para lubina es capaz de determinar actividades < 10 fmol/mg prot./h, se midió la actividad aromatasa a lo largo del primer año de vida (Fig. 37), cuando los valores se esperaban que fuesen nulos o muy bajos, al menos al principio, y descubrir en qué momento empezaba a ser detectable. Los resultados indicaron que en el cerebro los máximos de actividad precedieron en 50 días a los encontrados en la gónada, lo que indica que, como en la tilapia (Kwon et al., 2001), el cerebro podría ser el primer sitio de aromatización, en lugar de las gónadas, como se venía postulando hasta ahora.

El modelo propuesto para la diferenciación sexual en la lubina (basado en observaciones histológicas y bioquímicas) requiere la síntesis de estrógeno para el desarrollo de las gónadas, independientemente del sexo, hasta la diferenciación sexual, momento a partir del cual la necesidad de estrógeno se mantiene durante más tiempo sólo para el desarrollo específico del ovario (Fig. 38).

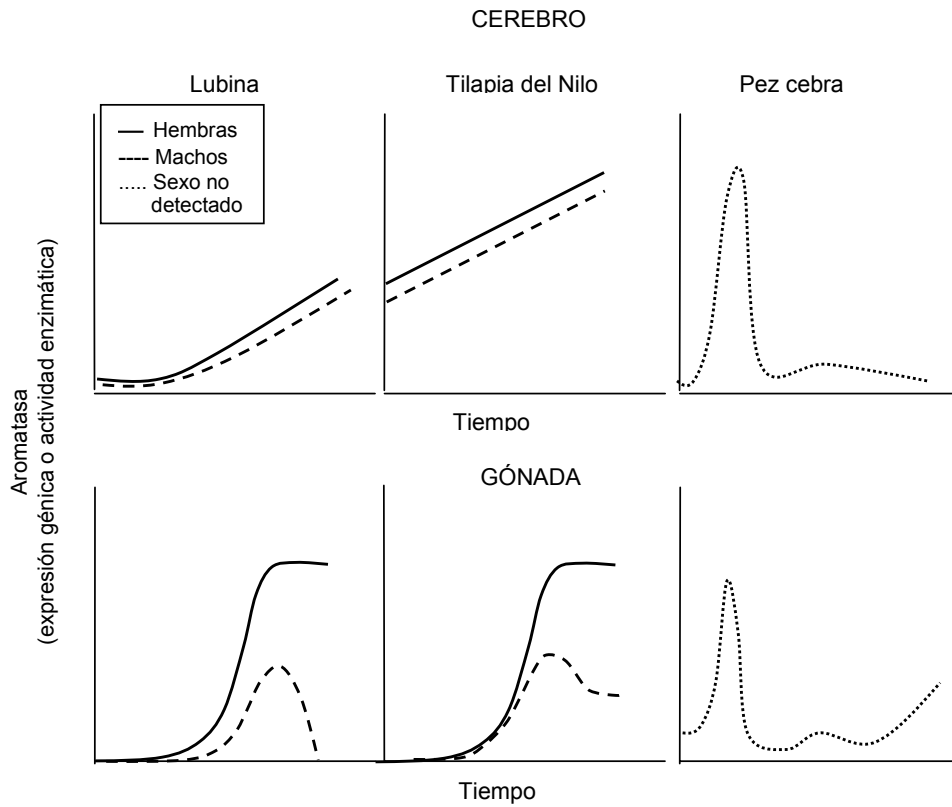


Fig. 37. Representación esquemática de la ontogenia de la actividad aromatasa en cerebro y gónadas de tres especies de teleósteos.

Del mismo modo, en la Fig. 37 se observa que en el ovario de la tilapia existe en ambos sexos un aumento paralelo de la expresión del gen de la aromatasa hasta los 15 DPF, y a partir de este momento se reduce actividad los machos mientras que la de las hembras continúa aumentando hasta alcanzar los máximos en el momento de diferenciación sexual (27-31 DPF) (Kwon et al., 2001). Así pues, queda reflejada la similitud de la lubina y la tilapia en cuanto al modelo de diferenciación sexual que siguen.

Por el contrario, en el pez cebra, la diferenciación sexual no parece seguir el mismo patrón, debido a que la máxima expresión del gen de la aromatasa se detecta en los primeros días después de la fertilización (Trant et al., 2001).

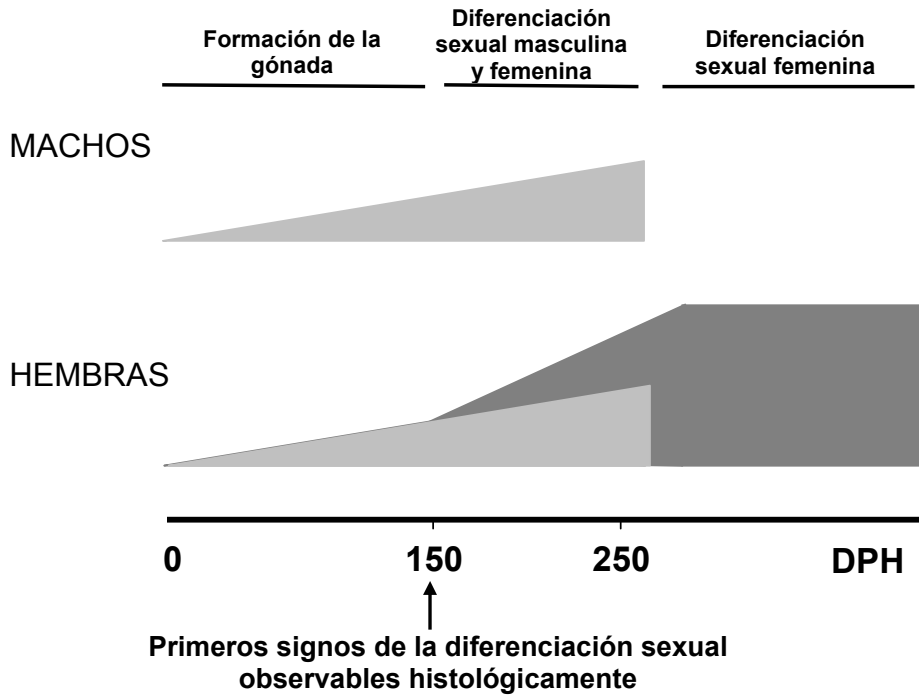


Fig. 38. Hipótesis sobre la acción de actividad aromatasa gonadal y el proceso de diferenciación sexual en la lubina. DPH = días después de la eclosión.

Para finalizar, mencionar que postular una tesis, llevar a cabo la investigación y redactar la memoria, además de intentar resolver los objetivos propuestos, siempre aporta nuevas incógnitas que requieren investigaciones futuras. Algunas de estas nuevas cuestiones a resolver surgidas de este trabajo serían las que se mencionan a continuación.

En primer lugar, y siguiendo el orden de esta discusión, quedaría por comprobar que las propiedades catalíticas de las dos isoformas del gen de la aromatasa se mantienen al transfectar células COS o CHO. Con respecto a la distribución neuroanatómica, sería interesante estudiar la actividad aromatasa en las distintas partes del cerebro a lo largo del año para estudiar las posibles diferencias relativas, además de las encontradas en el cerebro entero. En relación con la distribución anatómica, cabría comprobar la expresión del gen de la aromatasa en el hígado, riñón anterior y grasa visceral o realizar recristalización a actividad específica constante para confirmar que la actividad encontrada por el método del agua tritiada es equivalente a la síntesis de estrógenos en dichos tejidos. Teniendo en cuenta que el fin último de esta tesis era contribuir al estudio de la implicación de la aromatasa en la diferenciación sexual de la lubina, convendría estudiar los efectos del inhibidor endógeno $11\beta\text{-OH}\Delta^4$ sobre la actividad aromatasa durante el primer año de vida para comprobar si tiene alguna implicación en la diferenciación sexual como se sugiere. Del mismo modo, faltaría estudiar los efectos de la temperatura tanto sobre la expresión del gen como sobre la actividad enzimática ya que se sabe que la temperatura afecta la proporción de sexos de la lubina pero no se conoce a través de que método, sí directamente sobre el genotipo (TSD = temperature sex determination) o a través i.e. de la actividad aromatasa y por tanto sobre el fenotipo (TSD = temperature sex differentiation). Finalmente, y también relacionado con la diferenciación sexual, sería interesante analizar el patrón de expresión del gen de la aromatasa durante el primer año de vida y compararlo con el patrón de la actividad aromatasa, para determinar la relación que existe entre el gen y su proteína.

Finalmente, mencionar que la disponibilidad de un ensayo para medir actividad aromatasa en un pez como la lubina permite también su aplicación en disciplinas como es la toxicología, si se tiene en cuenta que muchos contaminantes presentes en el medio acuático son capaces de afectar la actividad aromatasa de los peces.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- Se ha puesto a punto, optimizado y validado el método radiométrico del agua tritiada para cuantificar la actividad aromatasas en la lubina, teniendo en cuenta todas las variables que son propias de este tipo de análisis. En este sentido, pequeñas alteraciones en algunas de ellas resultaron en notables cambios en la actividad medida, lo que indica la necesidad y trascendencia de una validación adecuada.

2.- La actividad catalítica de la aromatasas por unidad de proteína es en el cerebro unas cinco veces mayor que en el ovario, independientemente del tipo de preparación usada, acorde con los datos obtenidos en carpa dorada, donde la relación fue de diez veces. Este trabajo es el primero que compara la actividad aromatasas en su forma nativa en cerebro y ovario, y en un mismo pez.

3.- La constante de afinidad de Michaelis-Menten de la aromatasas de lubina, la única disponible de momento para un pez marino, no difiere entre la forma del cerebro y la del ovario, y se encuentra entre las más bajas calculadas en peces, lo que indica una alta afinidad del enzima por el sustrato. Además, el valor de dicha constante está situado dentro del rango de concentraciones de andrógeno en plasma, lo que permite cambios de la actividad dependientes del sustrato, en concordancia con un rol fisiológico *in vivo*.

4.- En el cerebro de la lubina, la actividad aromatasas tiene lugar fundamentalmente en su parte anterior y ventral, además de en la hipófisis, y es mayor en machos que en hembras. Esta actividad se acentúa en la época de puesta, lo que sugiere un papel importante de la aromatasas en la regulación cerebral de la maduración gonadal, implicando a los neuroestrógenos en el control del ciclo reproductor.

5.- Se demuestra, de forma novel en peces, la presencia de niveles bajos pero detectables de actividad aromatasas en hígado, grasa visceral y riñón anterior, este último ya aceptado como órgano endocrino en teleósteos. En el hígado, esta actividad podría complementar al estrógeno ovárico en la estimulación de la producción hepática de vitelogenina, tal y como ha sido postulado para una especie de anfibio; mientras que en la grasa visceral la síntesis de estrógeno podría estar relacionada con el control del equilibrio energético, tal y como ocurre en mamíferos.

6.- Se ha descubierto que la 11β -hidroxiandrostenediona es capaz de inhibir la actividad aromatasas neural y gonadal. El efecto es dosis-dependiente, específico, reversible y del tipo competitivo total, lo que indica que se debe a una inhibición directa del enzima y no a una competencia por el sustrato. Esto, junto con la demostración de su producción endógena, sugiere que este andrógeno puede potenciar su efecto a través de la inhibición simultánea de la aromatasas y la consiguiente menor producción de estrógeno. Resultados preliminares *in vivo* confirman esta inhibición *in vitro*, pero queda aún por determinar en qué circunstancias se produce.

7.- La actividad aromatasas en la lubina es detectable ya en los estadios postlarvarios. En el cerebro, que podría ser el primer sitio de aromatización, esta actividad es independiente del sexo pero en la gónada es mayor en las futuras hembras un mes antes de la diferenciación sexual, disminuyendo bruscamente hasta valores indetectables sólo en los machos. La ontogenia de la actividad aromatasas en la lubina sugiere un mecanismo diferente del propuesto para otras especies de peces, en tanto que sería necesaria para la formación de la gónada y las primeras etapas de la diferenciación de ambos sexos, pero sólo para la ulterior diferenciación y crecimiento gonadal en las hembras. Ello satisface el conocido rol mitogénico de los estrógenos durante la diferenciación de los tejidos y órganos en todos los vertebrados.

8.- En el rango de temperaturas donde la lubina puede vivir, la actividad aromatasa está estrechamente ligada a cambios de esta variable ambiental. Ello, junto con el ahora conocido hecho de que la temperatura es capaz de modificar la proporción de sexos de esta especie, sugiere la posibilidad de que los mencionados efectos estén mediados por variaciones en la actividad aromatasa y, por tanto, por el equilibrio entre andrógenos y estrógenos.

9.- La disponibilidad de un ensayo validado de actividad aromatasa en un pez como la lubina abre interesantes perspectivas en futuras investigaciones: de carácter básico, tanto en endocrinología como en relación a los cambios de temperatura ambiental, si se tiene en cuenta que la lubina es un modelo de investigación consolidado en buena parte de Europa; de carácter aplicado, en relación con los cultivos marinos, al ser una especie de innegable interés económico; y en toxicología acuática, por vivir en las zonas litorales, donde la contaminación de carácter antropogénico se manifiesta con mayor intensidad.

BIBLIOGRAFÍA

A

- Ackerman GE, Smith ME, Mendelson CR, McDonald P, Simpson E. (1981). Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. **Clin. Endocrinol. Metabol.** 53: 412-417.
- Afonso LO, Campbell PM, Iwama GK, Devlin RH, Donaldson EM. (1997). The effect of the aromatase inhibitor fadrozole and two polynuclear aromatic hydrocarbons on sex steroid secretion by ovarian follicles of coho salmon. **Gen. Comp. Endocrinol.** 106: 169-174.
- Andersson E, Borg B, Lambert JG. (1988). Aromatase activity in brain and pituitary of immature and mature Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. **Gen. Comp. Endocrinol.** 72: 394-401.
- Anglade I, Mazurais D, Douard V, Le Jossic-Corcus C, Mañanos EL, Michel D, Kah O. (1999). Distribution of glutamic acid decarboxylase mRNA in the forebrain of the rainbow trout as studied by in situ hybridization. **J. Comp. Neurol.** 410: 277-289.
- Antonopoulou E, Mayer I, Berglund I, Borg B. (1995). Effects of aromatase inhibitors on sexual maturation in Atlantic salmon, *Salmo salar*, male parr. **Fish Physiol. Biochem.** 14: 15-24.
- Assisi L, Di Fiore MM, Lamanna C, Botte V. (2000). Relationships between liver testosterone receptor isoforms and aromatase activity in female green frog, *Rana esculenta*. **Life Sci.** 67: 373-382.

Asturiano JF, Sorbera LA, Ramos J, Carrillo M, Zanuy S. (1997). Patrón de maduración y ovulación durante la época natural de puesta de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) y observaciones sobre la inducción de la maduración de oocitos con gonadotropina. En: **Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura**. (Costa J, Abellán E, García B, Ortega A, Zamora S. Eds). Cartagena, Murcia. Pp: 347-352.

Asturiano JF, Sorbera LA, Ramos J, Kime DE, Carrillo M, Zanuy S. (2000). Hormonal regulation of the European sea bass reproductive cycle: an individualized female approach. **J. Fish Biol.** 56: 1155-1172.

Ayub M, Levell MJ. (1990). The inhibition of human prostatic aromatase activity by imidazole drugs including ketoconazole and 4-hydroxyandrostenedione. **Biochem. Pharmacol.** 40: 1569-1575.

B

Balthazart J. (1997). Steroid control and sexual differentiation of brain aromatase. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.** 61: 323-339.

Balthazart J, Ball GF. (1998). New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). **Trends Neurosci.** 21: 243-249.

Barnabé G. (1973). Contribution a la connaissance de la croissance et de la sexualité du loup (*Dicentrarchus labrax* L.) de la région de Sète. **Ann. Inst. Océanogr.** 49: 49-75.

- Barnabé G. (1976). Contribution a la connaissance de la biologie du loup *Dicentrarchus labrax* (L.) (Poisson Serranidae). **Thèse Doctorat Etat**, mention sciences, Univ. Sc. Techn. Languedoc, Montpellier 426 p.
- Baroiller JF, Chourrout D, Fostier A, Jalabert B. (1995). Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. **J. Exp. Zool.** 273: 216-233.
- Baroiller JF, Guiguen Y, Fostier A. (1999). Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cell Mol. Life Sci.** 55: 910-931.
- Baroiller JF, Guiguen Y, Iseki K, Fostier A. (1998). Physiological role of androgens on gonadal sex differentiation in two teleost fish, *Oncorhynchus mykiss* and *Oreochromis niloticus*. **J. Exp. Zool.** 281: 506-507.
- Baroiller JF, Toguyeni A. (1996). Comparative effects of a natural steroid, 11 α β -hydroxy-androstenedione (11 α β -OH-D4) and a synthetic androgen, 17 α α -methyltestosterone (17 α α -MT) on sex ratio in *Oreochromis niloticus*. **EnProceedings of the third international symposium on tilapia aquaculture.** (Pullin RSV, Lazard J, Legendre M, Amon Kothias JB, Pauly D, editors.) Abidjan, Côte d'Ivoire. pp 344-351.
- 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.

- Berstein LM, Santner SJ, Brodie AM, Koos RD, Naftolin F, Santen RJ. (1993). Pseudoaromatase in circulating lymphocytes. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 44: 647-649.
- Blázquez M, Carrillo M, Zanuy S, Piferrer F. (1999). Sex ratios in offspring of sex-reversed sea bass and the relationship between growth and phenotypic sex differentiation. **J. Fish Biol.** 55: 916-930.
- Blázquez M, Felip A, Zanuy S, Carrillo M, Piferrer F. (2001). Critical period of androgen-inducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass. **J. Fish Biol.** 58: 342-358.
- Blázquez M, Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, Donaldson EM. (1995). Development of sex control techniques for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) aquaculture: effects of dietary 17 α -methyltestosterone prior to sex differentiation. **Aquaculture.** 135: 329-342.
- Blázquez M, Zanuy S, Carrillo M, Piferrer F. (1998). Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). **J. Exp. Zool.** 281: 207-216.
- Bogart MH. (1987). Sex determination: a hypothesis based on steroid ratios. **J. Theor. Biol.** 128: 349-357.
- Borg B. (1994). Androgens in teleost fishes. **Comp. Biochem. Physiol. C.** 109: 219-245.

- Borg B, Timmers RJ, Lambert JG. (1987). Aromatase activity in the brain of the three-stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. I. Distribution and effects of season and photoperiod. **Exp. Biol.** 47: 63-68.
- Borg B, Timmers RJ, Lambert JG. (1987). Aromatase activity in the brain of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. II. Effects of castration in winter. **Exp. Biol.** 47: 69-71.
- Borg B, Andersson E, Mayer I, Lambert JG. (1989). Aromatase activity in the brain of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. III. Effects of castration under different conditions and of replacement with different androgens. **Exp Biol.** 48:149-152
- Brueggemeier RW. (2002). Aromatase inhibitors in breast cancer therapy. **Expert Rev Anticancer Ther.** 2: 181-191.
- Bull JJ. (1983). **Evolution of sex determining mechanisms.** The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, Menlo Park, Ca. 316 pp.
- C**
- Callard GV. (1992). Autocrine and paracrine role of steroids during spermatogenesis: studies in *Squalus acanthias* and *Necturus maculosus*. **J. Exp. Zool.** 261: 132-142.
- Callard GV, Petro Z, Ryan KJ. (1977). Conversion of androgen to estrogen and other steroids in the vertebrate brain. **Am. Zool.** 18: 511-523.

- Callard GV, Petro Z, Ryan KJ. (1978a). Phylogenetic distribution of aromatase and other androgen-converting enzymes in the central nervous system. **Endocrinology**. 103: 2283-2290.
- Callard GV, Petro Z, Ryan KJ. (1978b). Androgen metabolism in the brain and non-neural tissues of the bullfrog *Rana catesbeiana*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 34: 18-25.
- Callard GV, Petro Z, Ryan KJ. (1980). Aromatization and 5 α -reduction in brain and non-neural tissues of a cyclostome (*Petromyzon marinus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 42: 155-159.
- Callard GV, Petro Z, Ryan KJ. (1981a). Biochemical evidence for aromatization of androgen to estrogen in the pituitary. **Gen. Comp. Endocrinol.** 44: 359-364.
- Callard GV, Petro Z, Ryan KJ, Clairbone JB. (1981b). Estrogen synthesis in vitro and in vivo in the brain of a marine teleost (*Myoxocephalus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 43: 243-255.
- Callard GV, Pudney JA, Kendall SL, Reinboth R. (1984). In vitro conversion of androgen to estrogen in amphioxus gonadal tissues. **Gen. Comp. Endocrinol.** 56: 53-58.
- Callard GV, Specker JL, Knapp J, Nishioka RS, Bern HA. (1988). Aromatase is concentrated in the proximal pars distalis of tilapia pituitary. **Gen. Comp. Endocrinol.** 71: 70-79.
- Callard GV, Drygas M, Gelinis D. (1993). Molecular and cellular physiology of aromatase in the brain and retina. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.** 44: 541-547.

- Callard GV, Kruger A, Betka M. (1995). The goldfish as a model for studying neuroestrogen synthesis, localization, and action in the brain and visual system. **Env. Health Persp.** 103: 51-57.
- Callard GV, Tchoudakova AV, Kishida M, Wood E. (2001). Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of *cyp19* genes in teleost fish. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 79: 305-314.
- Carrillo M, Zanuy S, Prat F, Serrano R, Bromage N. (1993). Environmental and hormonal control of reproduction in sea bass. En: **Recent Advances in Aquaculture IV.** (Muir JF, Roberts RJ. eds.), Blackwell Scientific Publications, Londres, pp. 43-54.
- Carrillo M, Zanuy S, Blazquez M, Ramos J, Piferrer F, Donaldson EM. (1995). Sex control and ploidy manipulation in sea bass. In: OCDE Secretary-General Ed., **Environmental Impacts of Aquatic Biotechnology.** Publ. OCDE, Paris, pp. 125-143.
- Cavaco JEB, Bogerd J, Goos H, Schulz RW. (2001). Testosterone inhibits 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Biol. Reprod.** 65: 1807-1812.
- Cerdá-Reverter JM, Anglade I, Martínez-Rodríguez G, Mazurais D, Muñoz-Cueto JA, Carrillo M, Kah O, Zanuy S. (2000). Characterization of neuropeptide Y expression in the brain of a perciform fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **J. Chem. Neuroanat.** 19: 197-210.

- Cerdá-Reverter JM, Martínez-Rodríguez G, Anglade I, Kah O, Zanuy S. (2000). Peptide YY (PYY) and fish pancreatic peptide Y (PY) expression in the brain of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as revealed by in situ hybridization. **J. Comp. Neurol.** 426: 197-208.
- Cerdá-Reverter JM, Zanuy S, Muñoz-Cueto JA. (2001a). Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). I. The telencephalon. **J. Morphol.** 247: 217-228.
- Cerdá-Reverter JM, Zanuy S, Muñoz-Cueto JA. (2001b). Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) II. The Diencephalon. **J. Morphol.** 247: 229-251.
- Chang CF, Lin BY, Lau EL, Lee MF, Yueh WS, Lee YH, Chang CN, Huang JD, Tacon P, Lee FY, Du JL, Sun LT. (1997). The endocrine mechanism of sex reversal in the protandrous black porgy, *Acanthopargus schlegeli*: a review. **Chinese J. Physiol.** 40: 197-205.
- Chang CF, Hung CY, Chiang MC, Lan SC. (1999). The concentrations of plasma sex steroids and gonadal aromatase during controlled sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*. **Aquaculture.** 177: 37-45.
- Chang XT, Kobayashi T, Kajiura H, Nakamura M, Nagahama Y. (1997). Isolation and characterization of cDNA encoding the tilapia (*Oreochromis niloticus*) cytochrome P450 aromatase (P450arom): Changes in P450arom mRNA, protein and enzyme activity in ovarian follicles during oogenesis. **J. Mol. Endocrinol.** 18: 57-66.

- Chardard D, Desvages G, Pieau C, Dournon C. (1995). Aromatase activity in larval gonads of *Pleurodeles waltl* (Urodele Amphibia) during normal sex differentiation and during sex reversal by thermal treatment effect. **Gen. Comp. Endocrinol.** 99: 100-107.
- Chatain B, Peruzzi S, Saillant E. (2000). Sex determination in *Dicentrarchus labrax*. In: **Proceedings of the VIIth international Symposium "Genetics in aquaculture"**, Townsville, Australia.
- Cohen PG. (2001). Aromatase, adiposity, aging and disease. The hypogonadal-metabolic-atherogenic-disease and aging connection. **Med. Hypotheses.** 56: 702-708.
- Colombo L, Barbaro A, Francescon A, Libertini A, Bortolussi M, Argenton F, Dalla Valle L, Vianello S, Belvedere P. (1997). Towards an integration between chromosome set manipulation, intergeneric hybridization and gene transfer in marine fish culture. **Cahiers Options Méditerranéennes.** 34: 77-122.
- Conley A, Hinshelwood M. (2001). Mammalian aromatases. **Reproduction.** 121: 685-695.
- Conley AJ, Walters KW. (1999). **Aromatization. Encyclopedia of Reproduction.** Vol. 1. Pp. 280-291. Academic Press.
- Conover DO, Fleisher MH. (1986). Temperature sensitive period of sex determination in the Atlantic silverside, *Menidia menidia*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, 43: 514-520.
- Conover DO, Heins SW. (1987a). The environmental and genetic components of sex ratio in *Menidia menidia* (Pisces: Atherrinidae). **Copeia.** 3: 132-143.

Conover DO, Heins SW. (1987b). Adaptive variation in environmental and genetic sex determination in a fish. **Nature**. 326: 496-498.

Crews D, Bergeron JM, Bull JJ, Flores D, Tousignant A, Skipper JK, Wibbels T. (1994). Temperature-dependent sex determination in reptiles: proximate mechanisms, ultimate outcomes, and practical applications. **Dev. Genet.** 15: 297-312.

Cruz M, Canario AVM. (2000). cDNA cloning and expression of brain and ovary aromatase in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **6th International Symposium on the reproductive physiology of fish**. (Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO, eds.) Pub. Univ. Bergen (Norway). p 193.

D

Dalla Valle L, Lunardi L, Colombo L, Belvedere P. (2002). European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cytochrome P450arom: cDNA cloning, expression and genomic organization. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 80: 25-34.

Davies JH, Shearer RJ, Rowlands MG, Poon GK, Houghton J, Jarman M, Dowsett M. (1992). Effects of 4-hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione and its metabolites on 5 alpha-reductase activity and the androgen receptor. **J. Enzyme Inhib.** 6: 141-147.

D'Cotta H, Fostier A, Guiguen Y, Govoroun M, Baroiller JF. (2001). Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. **Mol. Reprod. Dev.** 59: 265-276.

De Arriaga MD, Soler J, Busto F, Cadenas E. (1998). **Manual de ejercicios de cinética enzimática**. 2^a Ed. Secretariado de publicaciones. Universidad de León. 305 p.

- De Mones A, Fostier A, Cauty C, Jalabert B. (1989). Ovarian early postovulatory development and oestrogen production in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) from a spring-spawning strain. **Gen Comp Endocrinol.** 74: 431-441.
- Desvages G, Pieau C. (1992). Time required for temperature-induced changes in gonadal aromatase activity and related gonadal structure in turtle embryos. **Differentiation.** 52: 13-18.
- Devlin RH, Nagahama Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture.** 208: 191-364.
- Dubois EA, Slob S, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJTh. (2001). Gonadal steroids and the maturation of the species-specific gonadotropin-releasing hormone system in brain and pituitary of the male African catfish (*Clarias gariepinus*). **Comp. Biochem. Physiol.** 129: 381-387.
- Doupe AJ. (1994). Seeds of instruction: Hippocampus and memory in food-storing birds. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91: 7381-7384.
- Dubois EA, Florijn MA, Zandbergen MA, Peute J, Goos HJ. (1998). Testosterone accelerates the development of the catfish GnRH system in the brain of immature African catfish (*Clarias gariepinus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 112: 383-393.

F

- Feist G, Yeoh CG, Fitzpatrick MS, Schreck CB. (1995). The production of functional sex-reversed male rainbow trout with 17alpha-methyltestosterone and 11-beta-hydroxyandrostenedione. **Aquaculture**. 131: 145-152.
- Felip A, Zanuy S, Carrillo M, Piferrer F. (2001). Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. **Genetica**. 111: 175-195.
- Fitzpatrick SL, Carlone DL, Robker RL, Richards JS. (1997). Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. **Steroids**. 62: 197-206.
- Fitzpatrick SL, Richards JS. (1991). Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. **Endocrinology**. 129: 1452-1462.
- Force A, Lynch M, Pickett FB, Amores A, Yan YL, Postlethwait J. (1999). Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. **Genetics**. 151: 1531-1545.
- Fostier A, Jalabert B, Billard R, Breton B, Zohar Y. (1983). The gonadal steroids. En: W.S. Hoar, D.J. Randall, E.M. Donaldson. (eds), **Fish Physiology, Vol. IXA**. pp. 277-372. Academic Press, Nueva York.
- Francis RC. (1992). Sexual lability in Teleosts: Developmental factors. **Q. Rev. Biol.** 67: 1-18.

G

- Gabriel WN, Blumberg B, Sutton S, Place AR, Lance VA. (2001). Alligator aromatase cDNA sequence and its expression in embryos at male and female incubation temperatures. **J. Exp. Zool.** 290: 439-448.
- García-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodríguez JR, Hutchison RE, Hutchison, JB. (1999). Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. **Neuroscience.** 89: 567-578.
- Gelinas D, Pitoc GA, Callard GV. (1998). Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. **Mol. Cell Endocrinol.** 138: 81-93.
- Gold JR. (1979). Cytogenetics. En: **Fish Physiology, Vol. VIII.** (Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM. Eds.), Academic Press, Nueva York, pp.353-405.
- Gomez JM, Weil C, Ollitrault M, Le Bail PY, Breton B, Le Gac F. (1999). Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Gen Comp Endocrinol.** 113: 413-428.
- González A, Piferrer F. (2000). Cytochrome P450 aromatase enzyme activity and reproduction in teleost fish: Studies in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). En: **6th International Symposium on the reproductive physiology of fish**, (Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO, eds.) Pub. Univ. Bergen (Norway). p 39-42.

- González A, Piferrer F. (2002). Characterization of aromatase activity in the sea bass. Effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. **J. Exp. Zool.** 293: 500-510.
- González A, Piferrer F. (2003). Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. **Gen. Comp. Endocrinol.** (In press).
- González FJ. (1992). Control of constitutively-expressed developmentally-activated rat hepatic cytochrome P450 genes. **Keio J. Med.** 41: 68-75.
- González-Martínez D, Madigou T, Zmora N, Anglade I, Zanuy S, Zohar Y, Elizur A, Muñoz-Cueto JA, Kah O. (2001). Differential expression of three different prepro-GnRH (Gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **J. Comp. Neurol.** 429: 144-155.
- Govoroun M, McMeel OM, D'Cotta H, Ricordel MJ, Smith T, Fostier, A, Guiguen Y. (2001). Steroid enzyme gene expressions during natural and androgen-induced gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J. Exp. Zool.** 290: 558-566.
- Govoroun M, McMeel OM, Mecherouki H, Smith TJ, Guiguen Y. (2001). 17beta-Estradiol treatment decreases steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid levels in the rainbow trout testis. **Endocrinology.** 142: 1841– 1848.
- Graddy LG, Kowalski AA, Simmen FA, Davis SLF, Baumgartner WW, Simmen RCM. (2000). Multiple isoforms of porcine aromatase are encoded by three distinct genes. **J. Steroid Biochem.Mol.Biol.** 73: 49-57.

- Guiguen Y, Jalabert B, Thouard E, Fostier A. (1993). Changes in plasma and gonadal steroid hormones in relation to the reproductive cycle and the sex inversion process in the protandrous seabass, *Lates calcarifer*. **Gen Comp Endocrinol.** 92: 327-338.
- Guiguen Y, Jalabert B, Benett A, Fostier A. (1995). Gonadal in vitro androstenedione metabolism and changes in some plasma and gonadal steroid hormones during sex inversion of the protandrous sea bass, *Lates calcarifer*. **Gen Comp Endocrinol.** 100: 106-118.
- Guiguen Y, Baroiller JF, Ricordel MJ, Iseki K, McMeel OM, Martin SA, 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.
- Guiguen Y, Govoroun M, D'Cotta H, McMeel OM, Fostier A. (2000). Steroids and gonadal sex differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. En: **6th International Symposium on the reproductive physiology of fish**, (Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO, eds.) Pub. Univ. Bergen (Norway). pp. 241-243.

H

- Hausler A, Schenkel L, Krahenbuhl C, Monnet G, Bhatnagar AS. (1989). An in vitro method to determine the selective inhibition of estrogen biosynthesis by aromatase inhibitors. **J. Steroid Biochem.** 33: 125-131.
- Hayes TB. (1998). Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. **J. Exp. Zool.** 281: 373-399.

- Hickey GJ, Krasnow JS, Beattie WG, Richards JS. (1990). Aromatase cytochrome P450 in rat ovarian granulosa cells before and after luteinization: adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and independent regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5' genomic DNA. **Mol. Endocrinol.** 4: 3-12.
- Higa GM. (2002). Exemestane: treatment of breast cancer with selective inactivation of aromatase. **Am. J. Health. Syst. Pharm.** 59: 2194-2201.
- Hostache G, Pascal M, Tessier C. (1995). Influence de la température d'incubation sur le rapport mâle:femelle chez l'atipa, *Hoplosternum littorale* Hancock (1828). **Can. J. Zool.** 73: 1239-1246.
- Houde ED, Zastrow CE. (1993). Ecosystem- and taxon-specific dynamic and energetics properties of fish larvae assemblages. **Bull. Mar. Sci.** 53: 290-335.
- Hunter GA, Donaldson EM. (1983). Hormonal sex control and its application to fish culture. En: **Fish Physiology, Reproduction, vol. IX**, Part B, (Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM. Eds.), Behavior and Fertility Control, Academic Press Nueva York, pp. 223-303.
- Hutchison JB. (2000). Estrogen in gender-specific neural differentiation. In: **Sexual Differentiation of the Brain**. Matsumoto A. (Ed.), CRC, New York, pp. 58-82.
- Hutchison JB, Schumacher M, Steimer Th, Gahr M. (1990). Are separable aromatase systems involved in hormonal regulation of the male brain? **J. Neurobiol.** 21: 743-759.

Hutchison JB, Wozniak A, Beyer C, Hutchison RE. (1996). Regulation of sex-specific formation of oestrogen in brain development: Endogenous inhibitors of aromatase. **J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.** 56: 201-207.

I

Ishani A, MacDonald R, Nelson D, Rutks I, Wilt TJ. (2000). Pygeum africanum for the treatment of patients with benign prostatic hyperplasia: a systematic review and quantitative meta-analysis. **Am. J. Med.** 109: 654-664.

J

Jeyasuria P, Place AR. (1997). Temperature-dependent aromatase expression in developing diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*) embryos. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 61: 415-425.

Jeyasuria P, Place AR. (1998). Embryonic brain-gonadal axis in temperature-dependent sex determination of reptiles: a role for P450 aromatase (*CYP19*). **J. Exp. Zool.** 281: 428-449.

Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S, Simpson ER. (2000). Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 97: 12735-12740.

K

- Kagawa H, Young G, Nagahama Y. (1984). In vitro estradiol-17 beta and testosterone production by ovarian follicles of the goldfish, *Carassius auratus*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 54: 139-143.
- Kah O, Anglade I, Lepetre E, Dubourg P, Monbrison D. (1993). The reproductive brain in fish. **Fish Physiol. Biochem.** 11: 85-89.
- Kah O, Zanuy S, Pradelles P, Cerdá JL, Carrillo M. (1994). An enzyme immunoassay for salmon gonadotropin-releasing hormone and its application to the study of the effects of diet on brain and pituitary GnRH in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 95: 464-474.
- Kah O, Zanuy S, Mañanós E, Anglade I, Carrillo M. (1991). Distribution of salmon gonadotrophin releasing-hormone in the brain and pituitary of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Cell Tissue Res.** 266: 129-136.
- Katagari M, Tatsuta K, Imaoka S, Funae Y, Honma K, Matsuo N, Yokoi H, Ishimura K, Ishibashi F, Kagawa N. (1998). Evidence that immature rat liver is capable of participating in steroidogenesis by expressing 17alpha-hydroxylase/17,20-lyase P450c17. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 64: 121-128.
- Kishida M, Callard GV. (2001). Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in Zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. **Endocrinology.** 142: 740-750.

- Kitano T, Takamune K, Kobayashi T, Nagahama Y, Abe SI. (1999). Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **J. Mol. Endocrinol.** 23: 167-176.
- Kitano T, Takamune K, Nagahama Y, Abe SI. (2000). Aromatase inhibitor and 17alpha-methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Mol. Reprod. Dev.** 56: 1-5.
- Kobayashi T, Nakamura M, Kajiura-Kobayashi H, Young G, Nagahama Y. (1998). Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450scc, P450c17, P450arom, and 3beta-HSD) in immature and mature testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cell. Tissue Res.** 292: 573-577.
- Komen J, Lambert JGD, Richter CJJ, Goos HJT. (1995). Endocrine control of sex differentiation in XX female, and in XY and XX male common carp (*Cyprinus carpio*, L). En: **Proceedings of the fifth international symposium on the reproductive physiology of fish.** (Goetz F, Thomas P, eds.) Austin, Texas. p 383.
- Koulish S, Kramer CR. (1989). hGC induces sex reversal in *Thalassoma bifasciatum*, a protogynous fish. **J. Cell Biol.** 107: 483a.
- Koumoundouros G, Divanach P, Anezaki L, Kentouri M. (2001). Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Mar. Biol.** 139: 817-830.
- Koumoundouros G, Pavlidis M, Anezaki L, Kokkari C, Sterioti A, Divanach P, Kentouri M. (2002). Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus*

labrax (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase. **J. Exp. Zool.** 292: 573-579.

Kramer CR, Imbriano MA. (1997). Neuropeptide Y (NPY) induces gonad reversal in the protogynous bluehead wrasse, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **J. Exp. Zool.** 279: 133-144.

Kwon JY, Haghpanah V, Kogson-Hurtado LM, McAndrew BJ, Penman DJ. (2000). Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. **J. Exp. Zool.** 287: 46-53.

Kwon JY, McAndrew BJ, Penman DJ. (2001). Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Mol. Reprod. Dev.** 59: 359-370.

L

Labrie F, Belanger A, Luu-The V, Labrie C, Simond J, Cusan L, Gomez JL, Candas B. (1998). DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: its role during aging. **Steroids.** 63: 322-328.

Laming PR. (1981). An introduction to the functional anatomy of the brains of fish and amphibians. In: **Brain Mechanisms of Behaviour in Lower Vertebrates**. Laming PR, editor. Cambridge University Press. London. pp.502-508.

Lenhinger AL, Nelson DL, Cox MM. (1993). **Principles of Biochemistry**. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. (2nd Ed.) Worth Publishers, Nueva

York. Pp-542-597.

Lephart ED, Simpson ER. (1991). Assay of aromatase activity. In: **Methods in Enzymology**, vol. 286. Academic Press, San Diego, pp. 477-483.

Liu S, Govoroun M, D'Cotta H, Ricordel MJ, Lareyre JJ, McMeel OM, Smith T, Nagahama Y, Guiguen Y. (2001). Expression of cytochrome P45011 α (11 α -hydroxylase) gene during gonadal sex differentiation and spermatogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 75: 291-298.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein determination with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

Luu-The V, Zhang Y, Poirier D, Labrie F. (1995). Characteristics of human types 1, 2 and 3 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities: oxidation/reduction and inhibition. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 55: 581-587.

M

Mañanós EL, Zanuy S, Carrillo M. (1997). Photoperiodic manipulations of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development, and plasma 17 β -estradiol and vitellogenin levels. **Fish Physiol. Biochem.** 16: 211-222.

Marchand O, Govoroun M, D'Cotta H, McMeel O, Lareyre J, Bernot A, Laudet V, Guiguen Y. (2000). DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Biochim. Biophys. Acta.** 1493: 180-187.

- Martel C, Melner MH, Gagne D, Simard J, Labrie F. (1994). Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD), 17 beta-HSD 5alpha-reductase and aromatase activities in the rhesus monkey. **Mol. Cell Endocrinol.** 104: 103-111.
- Martínez G, Rodríguez L, Carrillo M, Zanuy S. (1999). Attempts for the development of sex-specific DNA probes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) using subtractive hybridization. **Aquaculture.** 173, 12.
- Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. (2002). DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. **Nature.** 417: 559-563.
- Mayer I, Borg B, Berglund I, Lambert JG. (1991). Effects of castration and androgen treatment on aromatase activity in the brain of mature male salmon (*Salmo salar* L.) parr. **Gen. Comp. Endocrinol.** 82: 86-92.
- McEwen BS, Alves SE. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. **Endocrine. Rev.** 20: 279-307.
- Melamed P, Rosenfeld H, Elizur A, Yaron Z. (1998). Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. **Comp. Biochem. Physiol.** 119: 325-338.
- Melo AC, Ramsdell JS. (2001). Sexual dimorphism of brain aromatase activity in medaka: induction of a female phenotype by estradiol. **Environ. Health Persp.** 109: 257-264.

- Menuet A, Anglade I, Pellegrini E, Le Guevel R, Gueguen MM, Marmignon MH, Adrio F, Pakdel F, Kah O. (2002). Aromatase and estrogens receptors in fish brain: assembling the puzzle. En: **21th Conference of European Comparative Endocrinologists**, Bonn (Germany). p. 51.
- Metzdorf R, Gahr M, Fusani L. (1999). Distribution of aromatase, estrogen receptor, and androgen receptor mRNA in the forebrain of songbirds and nonsongbirds. **J. Comp. Neurol.** 407: 115-129.
- Miyashita K, Shimizu N, Osanai S, Miyata S. (2000). Sequence analysis and expression of the P450 aromatase and estrogen receptor genes in the *Xenopus* ovary. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 75: 101-107.
- Mommsen TP, Walsh PJ. (1988). Vitellogenesis and oocyte assembly. En: **Fish Physiology, vol. XI A**, (Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM. Eds.). Academic Press, Nueva York. pp. 347-406.
- N**
- Nagahama Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. En: **Fish Physiology, vol IX A** (Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM. Eds). Academic Press, Nueva York. pp.223-275.
- Nagahama Y. (1988). Cytodifferentiation of ovarian follicle cells during oocyte growth and maturation. **Cell Differ. Dev.** 25: 9-14.
- Nagahama Y, Yoshikuni M, Yamashita M, Tokumoto T, Katsu Y. (1995). Regulation of oocyte growth and maturation in fish. **Curr. Top. Dev. Biol.** 30: 103-145.

- Nakajin S, Shinoda M, Hall PF. (1986). Purification to homogeneity of aromatase from human placenta. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 134: 704-710.
- Nakamura M, Kobayashi T, Chang X, Nagahama Y. (1998). Gonadal sex differentiation in teleost fish. **J. Exp. Zool.** 281: 362-372.
- Navas JM, Thrush M, Ramos J, Zanuy S, Carrillo M, Bromage N. (1993). Calidad de puesta y niveles plasmáticos de vitelogenina en reproductores de lubina (*Dicentrarchus labrax*) mantenidos con diferentes dietas. En: **Actas del IV Congreso Nacional de Acuicultura**. Illa de Arousa., Pontevedra. Pp: 19-24.
- Navas JM, Anglade I, Bailhache T, Pakdel F, Breton B, Jego P, Kah O. (1995). Do gonadotrophin-releasing hormone neurons express estrogen receptors in the rainbow trout? A double immunohistochemical study. **J. Comp. Neurol.** 363: 461-474.
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, et al. (1993). The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. **DNA Cell Biol.** 12: 1-51.
- Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature. **Pharmacogenetics.** 6: 1-42.
- Nelson JS. (1994). **Fishes of the World**. John Wiley & Sons, Inc. (3ª edición), Nueva York, 600 pp.

Ngatcha BT, Luu-The V, Poirier D. (2000). Androsterone 3 β -substituted derivatives as inhibitors of type 3 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 10: 2533-2536.

Noaksson E, Tjarnlund U, Bosveld AT, Balk L. (2001). Evidence for endocrine disruption in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) in a remote Swedish Lake in the vicinity of a public refuse dump. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 174: 160-176.

O

Olivereau M, Callard G. (1985). Distribution of cell types and aromatase activity in the sculpin (*Myoxocephalus*) pituitary. **Gen. Comp. Endocrinol.** 58: 280-290.

Osawa Y, Spaeth DG. (1971). Estrogen biosynthesis. Stereospecific distribution of tritium in testosterone-1 α ,2 α -t₂. **Biochemistry.** 10: 66-71.

P

Parhar IS, Tosaki H, Sakuma Y, Kobayashi M. (2001). Sex differences in the brain of goldfish: gonadotropin-releasing hormone and vasotocinergic neurons. **Neuroscience.** 104: 1099-1110.

Pasmanik M, Callard GV. (1985). Aromatase and 5 alpha-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. **Gen. Comp. Endocrinol.** 60: 244-251.

Pasmanik M, Callard GV. (1988a). A high abundance androgen receptor in goldfish brain: characteristics and seasonal changes. **Endocrinology.** 123: 1162-1171.

- Pasmanik M, Callard GV. (1988b). Changes in brain aromatase and 5 α -reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). **Endocrinology**. 122: 1349-1356.
- Pasmanik M, Schlinger BA, Callard GV. (1988). In vivo steroid regulation of aromatase and 5 α -reductase activities in brain and pituitary of goldfish. **Gen. Comp. Endocrinol.** 71: 175-182.
- Patiño R, Davis K, Schoore JE, Uguz C, Strüssmann CA, Parker NC, Simco BA, Goudie CA. (1996). Sex differentiation of channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. **J. Exp. Zool.** 276: 209-218.
- Pavlidis M, Koumoundouros G, Steriote A, Somarakis S, Divanach P, Kentouri M. (2000). Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **J. Exp. Zool.** 287: 225-232.
- Pawson MG, Pickett GD, Witthames PR. (2000). The influence of temperature on the onset of first maturity in sea bass. **J. Fish Biol.** 56: 319-327.
- Pickett GD, Pawson MG. (1994). **Sea bass. Biology, exploitation and conservation.** Chapman and Hall. Londres. 337 pp.
- Pieau C, Dorizzi M, Richard-Mercier N. (1999). Temperature-dependent sex determination and gonadal differentiation in reptiles. **Cell Mol. Life Sci.** 55: 887-900.
- Piferrer F. (2001). Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture.** 197: 229-281.

- Piferrer F, Donaldson EM. (1991). Dosage-dependent differences in the effect of aromatizable and nonaromatizable androgens on the resulting phenotype of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Fish Physiol. Biochem.** 9: 145-193.
- Piferrer F, Baker IJ, Donaldson EM. (1993). Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 91: 59-65.
- Piferrer F, Zanuy S, Carrillo M, Solar I, Devlin R, Donaldson E. (1994). Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. **J. Exp. Zool.** 270: 255-262.
- Piferrer F, Blázquez M, Felip A, Ramos J, Carrillo M, Zanuy S. (1995). Manipulación de la producción de sexos en teleósteos y su aplicación en acuicultura. En: **Actas del Vº Congreso Nacional de Acuicultura.** (Castelló F, Calderer A. Eds.), Universidad de Barcelona. pp. 18-23.
- Porter TD. (1991). An unusual yet strongly conserved flavoprotein in bacteria and mammals. **Trends Biochem. Sci.** 16: 154-158.
- Prat F, Zanuy S, Carrillo M, de Mones A, Fostier A. (1990). Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. **Gen. Comp. Endocrinol.** 78: 361-373.
- Prefontaine M, Shih C, Pan CC, Bhavnani BR. (1990). Applicability of product isolation and the radiometric aromatase assays for the measurement of low levels of

aromatase: lack of aromatase activity in the human endometrium. **Endocrinology**. 127: 539-551.

Price DJ. (1984). Genetics of sex determination in fishes- A brief review. En: **Fish reproduction: strategies and tactics** (Potts GW, Wootton RJ, Eds.) Academic Press, Londres. pp. 77-89.

Price TM, O'Brien SN. (1993). Determination of estrogen receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) and cytochrome P450 aromatase mRNA levels in adipocytes and adipose stromal cells by competitive polymerase chain reaction amplification. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 77: 1041-1045.

R

Ravaglia MA, Lo Nostro FL, Maggese MC, Guerrero GA, Somoza GM. (1997). Characterization of molecular variants of GnRH, induction of spermiation and sex reversal using GnRH-A and domperidone in the protogynous diandric fish, *Synbranchus marmoratus* Bloch, (Teleostei, Synbranchidae). **Fish Physiol. Biochem.** 16: 425-436.

Rebers FE, Hassing GA, Zandbergen MA, Goos HJ, Schulz RW. (2000). Regulation of steady-state luteinizing hormone messenger ribonucleic acid levels, de novo synthesis, and release by sex steroids in primary pituitary cell cultures of male African catfish, *Clarias gariepinus*. **Biol. Reprod.** 62: 864-672.

Richard-Mercier N, Dorizzi M, Desvages G, Girondot M, Pieau C. (1995). Endocrine sex reversal of gonads by the aromatase inhibitor Letrozole (CGS 20267) in *Emys*

- orbicularis*, a turtle with temperature-dependent sex determination. **Gen. Comp. Endocrinol.** 100: 314-26.
- Roblin C, Bruslé J. (1983). Ontogenèse gonadique et différenciation sexuelle du loup *Dicentrarchus Labrax*, en conditions d'élevage. **Reprod. Nutr. Dévelop.** 23: 115-127.
- Rodríguez L, Carrillo M, Sorbera LA, Soubrier MA, Mañanos E, Holland MC, Zohar Y, Zanuy S. (2000a). Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. **Gen. Comp. Endocrinol.** 120: 67-74.
- Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M. (2000b). Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: Effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at puberty. **Fish Physiol. Biochem.** 23: 141-150.
- Römer U, Beisenherz W. (1996). Environmental determination of sex in *Apistogramma* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). **J. Fish. Biol.** 48: 714-725.
- Roselli CE, Klosterman SA. (1998). Sexual differentiation of aromatase activity in the rat brain: effect of perinatal steroid exposure. **Endocrinology.** 139: 3193-3201.
- Roselli CE, Resko JA. (2001). Cytochrome P450 aromatase (CYP19) in the non-human primate brain: distribution, regulation, and functional significance. **J Steroid Biochem Mol Biol.** Dec;79(1-5):247-53.

Ryan KJ. (1963). Biogenesis of estrogens. En: **Proceedings, 5th International Congress of Biochemistry**. Vol. VII. Pergamon, New York. pp. 381-394.

S

Saillant E, Fostier A, Haffray P, Menu B, Thimonier J, Chatain B. (2002). Temperature effects and genotype-temperature interactions on sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **J. Exp. Zool.** 292: 494-505.

Saligaut C, Linard B, Mañanos EL, Kah O, Breton B, Govorum M. (1998). Release of pituitary gonadotropins GtH I and GtH II in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Modulation by estradiol and catecholamines. **Gen. Comp. Endocrinol.** 109: 302-309.

Schlinger BA, Callard GV. (1987). A comparison of aromatase, 5 alpha-, and 5 beta-reductase activities in the brain and pituitary of male and female quail (*C. c. japonica*). **J. Exp. Zool.** 242: 171-180.

Scholz S, Gutzeit HO. (2000). 17-alpha-Ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). **Aquat. Toxicol.** 50: 363– 373.

Schulz RJ. (1993). Genetic regulation of temperature-mediated sex ratios in the livebearing fish *Poeciliopsis lucida*. **Copeia**: 1148-1151.

Schumacher M, Hutchison JB, Hutchison RE. (1991). Inhibition of hypothalamic aromatase activity by 5beta-dihydrotestosterone. **J. Neuroendocrinol.** 3: 221-226.

- Shaywitz SE, Shaywitz BA, Pugh KR, Fulbright RK, Skudlarski P, Mencl WE, Constable RT, Naftolin F, Palter SF, Marchione KE, Katz L, Shankweiler DP, Fletcher JM, Lacadie C, Keltz M, Gore JC. (1999). Effect of estrogen on brain activation patterns in postmenopausal women during working memory tasks. **J. Am. Med. Assoc.** 281: 1197-1202.
- Shilling AD, Carlson DB, Williams DE. (1999). Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, as a model for aromatase inhibition. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 70: 89-95.
- Siiteri PK, Thompson EA. (1975). Studies of human placental aromatase. **J. Steroid Biochem.** 6:317-322.
- Silverin B, Baillien M, Foidart A, Balthazart J. (2000). Distribution of aromatase activity in the brain and peripheral tissues of passerine and nonpasserine avian species. **Gen. Comp. Endocrinol.** 117: 34-53.
- Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon WC, Robertson K, Britt K, Speed C, Jones M. (2002). Aromatase- A brief overview. **Ann. Rev. Physiol.** 64: 93-127.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Bendelson CR, Bulun SE. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocrine. Rev.** 15: 342-355.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. (1990). A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature.** 346: 240-244.

Singh H, Thomas P. (1993). Mechanism of stimulatory action of growth hormone on ovarian steroidogenesis in spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 89: 341-353.

Sokal RR, Rohlf FJ. (1981). **Biometry**. The principles and practice of statistics in biological research. (2ª Ed.) Freeman WH y Co. New York. p. 859.

Solari AJ. (1994). Sex chromosomes and sex determination in fishes. En: **Sex chromosomes and sex determination in vertebrates**. CRC Press Inc., Boca Ratón, Florida. pp. 233-247.

T

Tanaka M, Fukuda S, Matsuyama M, Nagahama Y. (1995). Structure and promoter análisis of the cytochrome P450 aromatase gene of the teleost fish, medada (*Oryzias latipes*). **J. Biochem.** (Tokyo). 117: 719-725.

Tao YX, Lin HR, van der Kraak G, Peter RE. (1993). Hormonal induction of precocious sex reversal in the ricefield eel, *Monopterus albus*. **Aquaculture**. 118: 131-140.

Tave D. (1993). Review of basic genetics. En: **Genetics for fish hatchery managers** (2ª edición), Van Nostrand Reinhold, Nueva York, pp. 415.

Tchoudakova A, Callard GV. (1998). Identification of multiple *CYP19* genes encoding different cytochrome P₄₅₀ aromatase isozymes in brain and ovary. **Endocrinology**. 139: 2179-2189.

- Tchoudakova A, Kishida M, Wood E, Callard GV. (2001). Promoter characteristics of two *cyp19* genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 78: 427-439.
- Thompson EAJr, Siiteri PK. (1974). Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. **J. Biol. Chem.** 249: 5364-5372.
- Timmers RJM, Lambert JGD. (1987). Measurement of aromatase activity in the brain of the African catfish, *Clarias gariepinus*, a comparison of two assay methods. **Comp. Biochem. Physiol.** 88: 453-453.
- Timmers RJM, Lambert JGD, Peute J, Vullings HGB, Van Oordt PGWJ. (1987). Localization of aromatase in the brain of the male African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by microdissection and biochemical identification. **Comp. Neurol.** 258: 368-377.
- Tong SK, Chiang EF, Hsiao PH, Chung B. (2001). Phylogeny, expression and enzyme activity of zebrafish *cyp19* (P450 aromatase) genes. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 79: 299-303.
- Trant JM. (1994). Isolation and characterization of the cDNA encoding the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) form of cytochrome P450arom. **Gen. Comp. Endocrinol.** 95: 155-168.
- Trant JM, Gavasso S, Ackers J, Chung BC, Place AR. (2001). Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (*CYP19a* and *CYP19b*) in Zebrafish fry

(*Danio rerio*). **J. Exp. Zool.** 290: 475-483.

Tremblay MR., Poirier D. (1998). Overview of a rational approach to design type I 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors without estrogenic activity: chemical synthesis and biological evaluation. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.** 66: 179-191.

Tsai CL, Wang LH, Chang CF, Kao CC. (2000). Effects of gonadal steroids on brain serotonergic and aromatase activity during the critical period of sexual differentiation in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **J. Neuroendocrinol.** 12: 894-898.

Tyler CR, Pottinger TG, Coward K, Prat F, Beresford N, Maddix S. (1997). Salmonid follicle-stimulating hormone (GtH I) mediates vitellogenic development of oocytes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Biol. Reprod.** 57: 1283-1244.

V

Van den Hurk R, Richter CJJ, Janssen-Dommerholt J. (1989). Effects of alpha-methyltestosterone and 11beta-hydroxy-androstenedione on gonad differentiation in the African catfish, *Clarias gariepinus*. **Aquaculture.** 83: 179-191.

Veney SL, Rissman EF. (2000). Immunolocalization of androgen receptors and aromatase enzyme in the adult musk shrew brain. **Neuroendocrinology.** 72: 29-36.

Vorontsov NN. (1973). The evolution of sex chromosomes. En: **Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution.** (Chiarelli AB, Capan E. Eds.). Academic Press, Nueva York, pp. 619-657.

W

Williams CL. (1998). Estrogen effects on cognition across the lifespan. **Horm. Behav.** 34: 80-84.

Y

Yamamoto E. (1995). Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in Hirame Flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). Bull. Tottori Pref. **Fish Exp. Stn.** 34: 1-145.

Yamamoto T. (1953). Artificially induced sex reversal in genotypic males of the medaka *Oryzias latipes*. **J. Exp. Zool.** 123: 571-594.

Yamamoto T. (1969). Sex differentiation. **Fish Physiology**. W. S. Hoar and D. J. Randall. New York, Academic Press. 3. pp. 117-175.

Yamazaki F. (1983). Sex control and manipulation in fish. **Aquaculture**. 33: 329-354.

You L, Sar M, Bartolucci E, Ploch S, Whitt M. (2001). Induction of hepatic aromatase by *p,p'*-DDE in adult male rats. **Mol. Cell. Endocrinol.** 178: 207-214.

Young G. (1986). Cortisol secretion in vitro by the interrenal of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during smoltification: relationship with plasma thyroxine and plasma cortisol. **Gen. Comp. Endocrinol.** 63: 191-200.

Young G, Kagawa H, Nagahama Y. (1983). Evidence for a decrease in aromatase activity in the ovarian granulosa cells of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*)

associated with final oocyte maturation. **Biol. Reprod.** 29: 310-315.

Z

Zanuy S, Carrillo M, Mateos M, Trudeau V, Kah O. (1999). Effects of sustained administration of testosterone in pre-pubertal sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Aquaculture.** 177: 21-35.

Zanuy S, Carrillo M, Felip A, Rodríguez L, Blázquez M, Jesus Ramos, Piferrer F. (2001). Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Aquaculture.** 202: 187-203.

Zhao J, Mak P, Tchoudakova A, Callard G, Chen S. (2001). Different catalytic properties and inhibitor responses of the goldfish brain and ovary aromatase isozymes. **Gen. Comp. Endocrinol.** 123: 180-191.

Zhou DJ, Pompon D, Chen SA. (1991). Structure-function studies of human aromatase by site-directed mutagenesis: kinetic properties of mutants Pro-308 to Phe, Tyr-361 to Phe, Tyr-361 to Leu, and Phe-406 to Arg. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 88: 410-414.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Las hormonas esteroideas: esteroides sexuales, mineralocorticoides y corticosteroides, se forman a partir del colesterol como precursor. Los esteroides sexuales comprenden los andrógenos, estrógenos y progestágenos. La aromatasa es el enzima responsable de la conversión de andrógenos (testosterona y androstenediona, fundamentalmente) en estrógenos (estradiol y estrona, respectivamente), hormonas esteroideas sexuales formadas al final de la ruta esteroideogénica. Los andrógenos y estrógenos formados por 19 y 18 átomos de carbono, respectivamente, junto con los progestágenos, de 21 átomos de carbono, son los esteroides esenciales para el control endocrino de la reproducción en vertebrados. Prácticamente influyen en todos los aspectos de establecimiento y mantenimiento del género. De hecho, el desarrollo reproductivo no se llevaría a cabo correctamente en ausencia de estos esteroides o de sus receptores (Conley y Walters, 1999).

La biosíntesis de estrógenos está catalizada por un miembro de la superfamilia de citocromos P450, denominado citocromo P450 aromatasa. Dicha superfamilia está compuesta por más de 480 miembros repartidos en 74 familias, de las cuales la P450 aromatasa es el único miembro de la familia 19 (Nelson et al., 1996) dentro del subgrupo de hidroxilasas de esteroides, con una mayor especificidad catalítica por el metabolismo de esteroides que otros citocromos P450. El complejo catalíticamente activo está compuesto por una aromatasa citocromo P450 (P450arom), que se une al sustrato, y acoplada a ella una flavoproteína, la adenina dinucleótido fosfato (NADPH)-citocromo P450 reductasa (reductasa), que facilita el flujo de electrones necesarios para la oxidación del sustrato (Conley y Walters, 1999).

El citocromo P450 aromatasa está altamente conservado en todos los vertebrados y especialmente en mamíferos. El gen que codifica para esta proteína es el *Cyp19* y

dependiendo del tejido y especie, la aromatasa posee entre 490 y 525 aa (Chang et al., 1997; Cruz y Canario, 2000) y un peso molecular de ~55000 daltons. De hecho, entre la secuencia peptídica de mamíferos y la de peces existe de 50 a 90% de homología (Conley y Hinshelwood, 2001). A nivel genómico entre el gen humano (Simpson *et al.*, 1994) y el de medaka (Tanaka *et al.*, 1995), los límites de exón-intrón son prácticamente idénticos. Igualmente ocurre con la similitud de la flavoproteína, NADPH-citocromo-P450-reductasa, entre mamíferos y la trucha con un 76% (Porter, 1991).

En los últimos años se ha demostrado la existencia de dos isoformas de la aromatasa en algunas especies de teleósteos, una en cerebro (P450aromB) y otra en ovario (P450aromA). Según Genbank hasta el momento se han clonado las dos isoformas en tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (Chang *et al.*, 1997; Kwon *et al.*, 2001), pez dorado, *Carassius auratus* (Tchoudakova y Callard, 1998), tilapia de Mozambique, *Oreochromis mossambicus* (Cruz y Canario, 2000), lubina, *Dicentrarchus labrax* (Dalla Valle *et al.*, 2002; Blázquez y Piferrer, datos no publicados) y pez cebra, *Danio rerio* (Kishida y Callard, 2001), basándose en secuencias de DNA de genes expresados en esos órganos.

Todas las clases de vertebrados analizadas hasta la fecha muestran biosíntesis de estrógenos, incluyendo mamíferos, aves, reptiles, anfibios, teleósteos, elasmobranquios y agnatos (Callard *et al.*, 1978; Callard, 1980), así como en el protocordado *Amphioxus* (Callard *et al.*, 1984). Recientemente, parece haberse detectado síntesis de estrógeno en pulpos, aunque no se sabe bien la función de estos estrógenos en invertebrados. La familia de genes del citocromo P450 aromatasa y similares parece derivar de un antiguo linaje de los productos del gen P450 que divergió hace unos 1000 millones de años (Nelson *et al.*, 1993).

Descartado el modelo corticomedular y el mecanismo del antígeno H-Y, se le otorga a los esteroides sexuales el papel responsable de la diferenciación sexual. Tratamientos hormonales y manipulaciones ambientales permiten invertir el sexo en peces sugiriendo un papel importante de estos dos factores en la determinación sexual gonadal (Yamamoto, 1969; Bull, 1983; Yamazaki, 1983; Hunter y Donaldson, 1983; Baroiller et al., 1999). Los esteroides sexuales son los factores endógenos responsables de la diferenciación sexual en peces, los andrógenos de la masculinización y los estrógenos de la feminización (Yamamoto, 1969; Yamazaki, 1983; Nakamura et al., 1998; Baroiller et al., 1999). Existen diversos métodos para demostrar la implicación de los esteroides sexuales en la diferenciación sexual, tales como, la inversión de sexo, inhibición de enzimas esteroidogénicas o antagonistas de receptores de esteroides, la medida de esteroides plasmáticos y caracterización histológica de células productoras de esteroides (Baroiller et al., 1999). Cabe destacar que los esteroides implicados en la diferenciación sexual son endógenos, ya que actualmente se sabe que los factores ambientales influyen en la proporción de sexos.

El funcionamiento del eje cerebro-hipófisis-gónadas está sometido a la influencia de factores externos que pueden modificar su estado y cambiar el curso de los procesos que controla. Esta plasticidad del eje es precisamente una característica muy evidente en animales poiquilotermos como, por ejemplo, los peces. Es precisamente la influencia de factores ambientales como el fotoperíodo o la temperatura externa la que determina en buena medida la estacionalidad de las puestas (Conover y Fleisher, 1986; Conover y Heins, 1987a,b). Los neurotransmisores presentes en diferentes tipos neuronales del cerebro regulan la secreción de GnRH o DA por parte de las neuronas encargadas de dicha función. A su vez la GnRH tiene una importante función estimuladora de la secreción de GtHs mientras que la DA tiene una función eminentemente inhibidora. Las GtHs estimulan la secreción de esteroides sexuales en las gónadas. Existen dos tipos: GtH I (FSH en mamíferos) y GtH II (LH en mamíferos). En la trucha arco iris, la primera se

detecta tan pronto como dos semanas después de la eclosión del huevo y durante la vitelogénesis y la segunda al final de la maduración del oocito y durante la ovulación (Gómez et., 1999). Los esteroides sexuales, ejercen a su vez un mecanismo de regulación por retroalimentación sobre el eje hipotálamo-hipofisiario, que puede ser positivo o negativo en función del estado reproductivo del animal (Fostier et al., 1983; Borg, 1994).

Para que se produzca la expresión del sexo se requiere que ocurran tanto la determinación sexual como la diferenciación sexual. Así como la diferenciación sexual se refiere a los eventos que ocurren durante el desarrollo y permiten la expresión del sexo genético en el apropiado sexo fenotípico, la determinación sexual, de forma simplificada, se define como la suma de elementos genéticos que son responsables de la existencia de las gónadas y depende de la combinación de los cromosomas de los progenitores. Los genes determinantes del sexo no serán sólo responsables de la presencia de las gónadas sino también de su forma (órganos fusionados o un par de órganos), de sí se diferenciarán en testículos u ovarios, si los ovarios tendrán o no cavidad ovárica (no todos los ovarios la tienen), etc. (Piferrer, 2001).

Los esteroides sexuales regulan el eje cerebro-hipófisis-gónadas y consecuentemente la diferenciación sexual (Baroiller et al., 1999). Como en otros vertebrados, la actividad aromatasasa en peces está implicada en la retroalimentación de los esteroides sexuales y en la regulación en procesos clave en el ciclo ovárico, de ahí que la actividad aromatasasa este concentrada en el cerebro “reproductivo” y en la hipófisis (Callard *et al.*, 1981; Timmers *et al.*, 1987).

En teleósteos se ha sugerido que los andrógenos 11 β -hidroxilados en lugar de la T, como se pensaba tradicionalmente, están implicados en los procesos clave del desarrollo (Baroiller *et al.*, 1999) (Fig. 2), incluyendo la diferenciación gonadal, en donde la actividad aromatasasa juega un papel importante. De hecho, se ha demostrado que

tratamientos con andrógenos 11β -hidroxilados masculinizan gónadas sexualmente indiferenciadas en la trucha arco iris (Van den Hurk *et al.*, 1989; Feist *et al.*, 1995), la tilapia del Nilo (Baroiller and Toguyeni, 1996) y la carpa común, *Cyprinus carpio* (Komen *et al.*, 1995). En el pez gato africano, los 11β -hidroxiandrógenos provocan un aumento del tamaño de las neuronas secretoras de GnRH y disminuyen la secreción de LH por parte de la hipófisis (Rebers *et al.*, 2000). Inhibieron también la expresión del gen de la aromatasa ovárica en la trucha arco iris (Govoroun *et al.*, 2001). Por ello, es posible que la producción local de andrógenos 11β -hidroxilados pueda afectar la acción de la aromatasa.

Los efectos de los factores ambientales sobre la proporción de sexos ha sido objeto de estudio en reptiles, demostrando un efecto de la temperatura sobre la diferenciación sexual (Desvages y Pieau, 1992; Crews *et al.*, 1994; Richard-Mercier *et al.*, 1995; Jeyasuria y Place, 1997; Pieau *et al.*, 1999). Igualmente se han detectado diferencias en la expresión del gen de la aromatasa en reptiles cuyo periodo crítico de diferenciación sexual se llevó a cabo a diferentes temperaturas (Gabriel *et al.*, 2001). Asimismo, en teleósteos gonocoristas existen evidencias de los efectos de la temperatura sobre la proporción de sexos (Baroiller *et al.*, 1999).

La lubina es un modelo consolidado en investigación sobre fisiología de la reproducción en peces (Zanuy *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta la importancia de la aromatasa en la reproducción y diferenciación sexual, se considera interesante y necesario el estudio de este enzima. Sin embargo, teniendo en cuenta la relevancia de los enzimas esteroidogénicos en general y de la aromatasa en particular, no existía ningún estudio sobre ninguno de estos enzimas en esta especie (incluso en otros peces son escasos).

Los objetivos de esta tesis fueron:

1. Poner a punto un método para medir la actividad aromatasa.
2. Comprobar la existencia de dos actividades catalíticas del enzima.
3. Estudiar la distribución anatómica y neuroanatómica de la actividad aromatasa.
4. Analizar los cambios de la actividad aromatasa a lo largo del año y en relación con el ciclo reproductor y los niveles de esteroides sexuales en plasma.
5. Estudiar el patrón de la actividad aromatasa durante el primer año de vida.
6. Comprobar si los 11b-hidroxiandrógenos influían sobre la actividad aromatasa.

RESULTADOS

CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD AROMATASA EN LA LUBINA. EFECTOS DE LA TEMPERATURA Y DIFERENTES PROPIEDADES CATALÍTICAS DE HOMOGENADOS Y MICROSOMAS DE CEREBRO Y OVARIO.

Se han descubierto dos genes de la aromatasa en el cerebro y ovario de algunos teleósteos. Sin embargo, son escasos los datos sobre cinética enzimática de la aromatasa nativa así como sobre la actividad catalítica en peces, impidiendo la comparación de la actividad aromatasa de diferentes órganos dentro y entre especies. En este estudio, se ha optimizado y validado el ensayo de agua tritiada para medir la actividad aromatasa en la lubina usando 1β -[^3H]-androstenediona como sustrato en homogenados crudos y microsomas. La optimización de las variables del ensayo incluyeron el pH, la temperatura, la molaridad del tampón, el tiempo de incubación, cantidad de tejido fresco, concentración de sustrato y cofactor. La especificidad del ensayo fue verificada usando inhibidores conocidos, sustratos inapropiados e inactivación por calor. La fraccionación

subcelular reveló una actividad diez veces mayor en la fracción microsómica que en la citosólica. El ensayo fue también validado comparando los resultados con los obtenidos por el método directo de medida de estrona. El ensayo validado descrito permitió medidas de actividad aromatasa a niveles tan bajos como <10 fmol/mg protein/h. La diferenciación sexual es dependiente de la temperatura en la lubina. Se encontró que en el rango fisiológico de temperaturas donde la lubina puede vivir, 10-30°C, la actividad aromatasa es altamente dependiente de la temperatura de manera lineal (cerebro: $r^2 = 0.92$; $P < 0.001$; ovario: $r^2 = 0.94$; $P < 0.001$). Cuando se compararon los niveles de actividad aromatasa de homogenado de cerebro y ovario de un mismo pez durante la época de puesta, los valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) fueron 7,3 nM vs 4,6 nM, respectivamente, sin diferencias significativas entre los dos tejidos. Consecuentemente, la aromatasa de la lubina tiene una alta afinidad por la androstenediona, al igual que lo encontrado en el pez dorado, pero mucho mayor que en otras aromatasas de peces o mamíferos (30-435 nM). Por el contrario, la velocidad máxima de reacción del cerebro (V_{max} 7.8 pmol/mg prot/h) fue cuatro veces mayor ($P < 0.001$) que la del ovario (V_{max} 2.1 pmol/mg prot/h). Resultados consistentes fueron encontrados usando microsomas purificados. Aunque esta es la primera vez que se calculan los parámetros cinéticos de una aromatasa nativa de un mismo pez en dos tejidos diferentes, faltaría determinar si es el reflejo de dos isoformas distintas en esta especie en particular.

CAPÍTULO III. ACTIVIDAD AROMATASA EN EL CEREBRO DE LA LUBINA (*Dicentrarchus labrax* L.). DISTRIBUCIÓN Y CAMBIOS EN RELACIÓN A LA EDAD, SEXO Y CICLO REPRODUCTIVO ANUAL.

La actividad citocromo P450 aromatasa se midió en diferentes tejidos de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) usando el método del agua tritiada previamente optimizada y validada para esta especie. En peces adultos comenzando la época de reproducción, la

mayor parte de actividad aromatasa estaba localizada en el cerebro ($2,04 \pm 0,4$ pmol/mg prot/h; media \pm ESM), seguida del ovario ($0,59 \pm 0,1$) y fue detectable en grasa visceral ($0,21 \pm 0,05$), hígado ($0,08 \pm 0,009$), y riñón anterior ($0,03 \pm 0,004$). Sin embargo, la actividad aromatasa fue despreciable en el resto de tejidos analizados: corazón, testículo, músculo y bazo. Consistente con resultados obtenidos en otras especies, la disección del cerebro en las principales partes constitutivas reveló que la actividad aromatasa estaba concentrada en las áreas implicadas en el control de la reproducción, que incluye el bulbo olfatorio, telencéfalo, y hipotálamo (oscilando desde 2,6 a 16,2 pmol/mg prot/h), así como la glándula hipofisiaria (6,2-9,3 pmol/mg prot/h). Una menor actividad aromatasa se detectó en el bulbo óptico, cerebelo y medula. Sin embargo, en contra de algunos artículos publicados previamente en referencia al contenido y distribución de la aromatasa neural en peces, los machos mostraron consistentemente una mayor actividad aromatasa que las hembras. En peces juveniles de un año de edad completando el proceso de diferenciación sexual gonadal, la actividad aromatasa del cerebro (0,63 pmol/mg prot/h) fue similar en ambos sexos y diez veces menor que la medida en el cerebro de peces que se encontraban en su primera época de puesta (6,52 pmol/mg prot/h), en este caso con machos mostrando un 24% mayor actividad que las hembras. Cuando la actividad aromatasa se midió a lo largo del año la del cerebro cambió dramáticamente durante el ciclo reproductivo. Los máximos valores que obtuvieron, ~ 7 pmol/mg prot/h, coincidieron con la época de puesta. Dos meses antes del pico de actividad aromatasa de cerebro se encontró el pico de testosterona plasmática y un mes antes el del índice gonadosomático. Esta es la primera medida de distribución de la actividad de un enzima esteroidogénico en la lubina, un modelo establecido en endocrinología comparada. En conjunto, estos resultados demostraron variaciones en la actividad aromatasa relacionadas con el sexo y la estacionalidad, y establecen la base para futuros estudios comparativos de acciones mediadas por andrógeno a través del estrógeno formado localmente tanto en tejidos diana centrales como periféricos.

CAPÍTULO IV. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD AROMATASA DEL CEREBRO Y OVARIO DE LA LUBINA POR LA 11 β -HIDROXIANDROSTENEDIONA PERO NO POR LA 11 β -HIDROXITESTOSTERONA

Se ha sugerido que en peces teleósteos los 11 β -hidroxiandrógenos en lugar de la testosterona (T) están implicados en procesos clave del desarrollo, incluyendo la diferenciación gonadal, un proceso en el que se reconoce que la actividad aromatasa juega un papel importante. Recientemente, se ha sugerido también que el cerebro puede estar implicado en la diferenciación sexual en peces. Por consiguiente, es posible que los 11-hidroxiandrógenos producidos localmente pueden afectar la acción de la aromatasa del cerebro. Cuando los homogenados del cerebro de la lubina se incubaron con androstenediona tritiada se encontró que los principales metabolitos producidos fueron, en orden decreciente: T, 11-hidroxiandrógenos y estrógenos, indicando que la 11 β -hidroxilasa (11 β -H) y la aromatasa están de hecho compitiendo por el mismo sustrato. Incubaciones posteriores mostraron que la actividad aromatasa neural fue inhibida específicamente de manera dosis-dependiente por la 11 β -hidroxiandrostenediona (11 β OH Δ^4) pero no por la 11 β OHT. En el ensayo estándar de la aromatasa, la representación de Dixon reveló que esta inhibición fue de tipo lineal (total) y competitiva con una $K_i = 36,5 \pm 3,5 \mu\text{M}$, un valor de sólo uno o dos órdenes de magnitud mayor que el de los potentes inhibidores de aromatasa 4-OH Δ^4 y Fadrozole (CGS 16949A). Sin embargo, cuando las concentraciones de sustrato se redujeron un orden de magnitud para evitar la saturación del sustrato, la K_i fue más apropiada obteniéndose $2,8 \mu\text{M}$. La 11 β OH Δ^4 también fue capaz de inhibir la actividad aromatasa del ovario ($K_i = 47,3 \pm 4,7 \mu\text{M}$ en el ensayo estándar de la aromatasa). Experimentos adicionales usando mitotano, un inhibidor específico de la 11 β -H, confirmó que la inhibición de la actividad aromatasa neural por 11 β OH Δ^4 fue reversible. En conjunto, estos resultados demostraron que la

$11\beta\text{OH}\Delta^4$ puede inhibir la actividad aromatasa en peces. Quedaría por confirmar si los resultados se pueden ser replicados in vivo para confirmar la $11\beta\text{OH}\Delta^4$ como un inhibidor endógeno de aromatasa. Resultados preliminares indicaron una inhibición de la actividad aromatasa en el cerebro de la lubina.

CAPÍTULO V. DIFERENCIAS RELACIONADAS CON EL SEXO EN LA ONTOGENIA DE LA ACTIVIDAD AROMATASA DEL CEREBRO Y OVARIO DURANTE EL PRIMER AÑO DE VIDA DE LA LUBINA (*Dicentrarchus labrax*)

El objetivo último de este estudio fue dilucidar la posible implicación de la actividad aromatasa en el proceso de diferenciación sexual en la lubina (*Dicentrarchus labrax*, L.). Con el fin que obtener grupos de dominancia de machos y de hembras, se llevaron a cabo varias separaciones por tamaño para separar peces pequeños de grandes comenzando a los 56 días después de la eclosión (DPH). Cada ~50 días se tomaron muestras de cerebro y gónada para analizar la actividad aromatasa hasta los 298 DPH. La separación por tallas resultó en un grupo de peces grandes con 96% de hembras, 59,1% en el grupo control y 35,4% en el grupo de pequeños. El peso y la longitud de los peces de los diferentes grupos aumentó hasta los 198 DPH, cuando las diferencias entre los grupos comenzaron a ser más evidentes. Los mayores valores encontrados a los 298 DPH fueron 130 g y ~20 cm. En referencia a la actividad aromatasa, en el cerebro de los peces tanto del grupo de pequeños como del grupo de grandes aumentó desde ~15 fmol/mg prot/h a los 56 DPH hasta 550 fmol/mg prot/h a los 298 DPH, con un pico de ~300 fmol/mg prot/h a los 198 DPH sin diferencias significativas entre los grupos de pequeños y grandes extremos. Sin embargo, en las gónadas la actividad aromatasa fue significativamente mayor en el grupo de peces grandes a los 100 DPH y el pico de la actividad aromatasa se encontró a los 248 DPH con valores mayores a 2 pmol/mg prot/h en el grupo de grandes y

0,8 pmol/mg prot/h en el de pequeños. La actividad aromataasa del grupo de peces pequeños a los 298 DPH disminuyó a valores indetectables, mientras que la actividad aromataasa de los peces del grupo de los grandes mostró una ligera disminución sin diferencias significativas con respecto a los valores del muestreo de 248 DPH. El sexo fenotípico pudo ser detectado histológicamente tan pronto como 143 DPH (~190 mm), aproximadamente un mes más tarde que las diferencias entre las actividades aromataasa de las gónadas de los grupos de peces grandes y pequeños. Las gónadas ya estuvieron bien diferenciadas a los 250 DPH, y sus actividades aromatasas coincidieron con los valores de actividad aromataasa gonadal alcanzados en adultos en la época de puesta. El grupo de peces pequeños mostró un descenso a los 298 DPH que podía reflejar el no requerimiento de producción de estrógeno para el desarrollo del testículo, porque eventualmente todos los peces del grupo de pequeños a esta edad eran machos. En conjunto, estos resultados sugieren que el cerebro puede ser el sitio de aromatización primario en la lubina, y la implicación de la actividad aromataasa en el desarrollo gonadal en ambos sexos, con un requerimiento extra de actividad aromataasa para el desarrollo específico del ovario y la no síntesis de estrógeno para el desarrollo de machos.

CONCLUSIONES

1.- Se ha puesto a punto, optimizado y validado el método radiométrico del agua tritiada para cuantificar la actividad aromataasa en la lubina, teniendo en cuenta todas las variables que son propias de este tipo de análisis. En este sentido, pequeñas alteraciones en algunas de ellas resultaron en notables cambios en la actividad medida, lo que indica la necesidad y trascendencia de una validación adecuada.

2.- La actividad catalítica de la aromataasa por unidad de proteína es en el cerebro unas cinco veces mayor que en el ovario, independientemente del tipo de preparación usada,

acorde con los datos obtenidos en carpa dorada, donde la relación fue de diez veces. Este trabajo es el primero que compara la actividad aromatasa en su forma nativa en cerebro y ovario, y en un mismo pez.

3.- La constante de afinidad de Michaelis-Menten de la aromatasa de lubina, la única disponible de momento para un pez marino, no difiere entre la forma del cerebro y la del ovario, y se encuentra entre las más bajas calculadas en peces, lo que indica una alta afinidad del enzima por el sustrato. Además, el valor de dicha constante está situado dentro del rango de concentraciones de andrógeno en plasma, lo que permite cambios de la actividad dependientes del sustrato, en concordancia con un rol fisiológico *in vivo*.

4.- En el cerebro de la lubina, la actividad aromatasa tiene lugar fundamentalmente en su parte anterior y ventral, además de en la hipófisis, y es mayor en machos que en hembras. Esta actividad se acentúa en la época de puesta, lo que sugiere un papel importante de la aromatasa en la regulación cerebral de la maduración gonadal, implicando a los neuroestrógenos en el control del ciclo reproductor.

5.- Se demuestra, de forma novel en peces, la presencia de niveles bajos pero detectables de actividad aromatasa en hígado, grasa visceral y riñón anterior, este último ya aceptado como órgano endocrino en teleósteos. En el hígado, esta actividad podría complementar al estrógeno ovárico en la estimulación de la producción hepática de vitelogenina, tal y como ha sido postulado para una especie de anfibio; mientras que en la grasa visceral la síntesis de estrógeno podría estar relacionada con el control del equilibrio energético, tal y como ocurre en mamíferos.

6.- Se ha descubierto que la 11β -hidroxiandrostenediona es capaz de inhibir la actividad aromatasa neural y gonadal. El efecto es dosis-dependiente, específico, reversible y del tipo competitivo total, lo que indica que se debe a una inhibición directa del enzima y no

a una competencia por el sustrato. Esto, junto con la demostración de su producción endógena, sugiere que este andrógeno puede potenciar su efecto a través de la inhibición simultánea de la aromatasas y la consiguiente menor producción de estrógeno. Resultados preliminares *in vivo* confirman esta inhibición *in vitro*, pero queda aún por determinar en qué circunstancias se produce.

7.- La actividad aromatasas en la lubina es detectable ya en los estadios postlarvarios. En el cerebro, que podría ser el primer sitio de aromatización, esta actividad es independiente del sexo pero en la gónada es mayor en las futuras hembras un mes antes de la diferenciación sexual, disminuyendo bruscamente hasta valores indetectables sólo en los machos. La ontogenia de la actividad aromatasas en la lubina sugiere un mecanismo diferente del propuesto para otras especies de peces, en tanto que sería necesaria para la formación de la gónada y las primeras etapas de la diferenciación de ambos sexos, pero sólo para la ulterior diferenciación y crecimiento gonadal en las hembras. Ello satisface el conocido rol mitogénico de los estrógenos durante la diferenciación de los tejidos y órganos en todos los vertebrados.

8.- En el rango de temperaturas donde la lubina puede vivir, la actividad aromatasas está estrechamente ligada a cambios de esta variable ambiental. Ello, junto con el ahora conocido hecho de que la temperatura es capaz de modificar la proporción de sexos de esta especie, sugiere la posibilidad de que los mencionados efectos estén mediados por variaciones en la actividad aromatasas y, por tanto, por el equilibrio entre andrógenos y estrógenos.

9.- La disponibilidad de un ensayo validado de actividad aromatasas en un pez como la lubina abre interesantes perspectivas en futuras investigaciones: de carácter básico, tanto en endocrinología como en relación a los cambios de temperatura ambiental, si se tiene en cuenta que la lubina es un modelo de investigación consolidado en buena parte de

Europa; de carácter aplicado, en relación con los cultivos marinos, al ser una especie de innegable interés económico; y en toxicología acuática, por vivir en las zonas litorales, donde la contaminación de carácter antropogénico se manifiesta con mayor intensidad.