

# Efectos de la castración y la administración de esteroides sexuales sobre la regulación del sistema kisspeptina en el hipotálamo de lubinas adultas

M. V. Alvarado, G. Molés, M. Carrillo y A. Felip

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (IATS), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Ribera de Cabanes, 12595, Castellón. e-mail: [valvarado@iats.csic.es](mailto:valvarado@iats.csic.es)

## Abstract

The existence of two different *kiss* and *gpr54* genes, whose products probably play a critical role in the regulation of the gonadotropic axis, has been reported in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). To test the hypothesis that sex steroids regulate *kiss/gpr54* gene expression, we analyzed the expression of these genes in adult male and female sea bass according to the following experimental design. In the case of males three groups were organized as follows: gonad-intact fish containing empty silastic implants (sham-control), castrated fish (GDX) implanted with either testosterone containing (GDX+T) or empty (GDX-T) silastic implants. In the case of females, three groups were established including: gonad-intact fish containing empty silastic implants (sham-control), castrated fish (OVX) implanted with either estradiol-17beta containing (OVX+E<sub>2</sub>) or empty (OVX-E<sub>2</sub>) silastic implants. Blood, brain and pituitary samples were periodically collected after sex steroid replacement for hormonal and molecular analysis. The participation of sexual steroids in the feedback control of the kisspeptin and GnRH/gonadotropin systems are discussed.

## Justificación

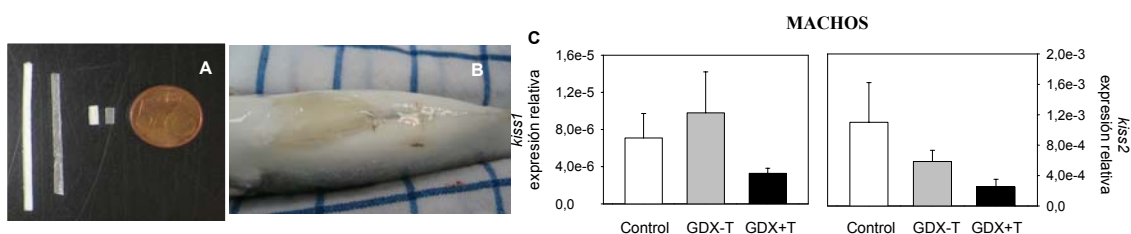
Se sabe que la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) posee dos genes *kiss* (*kiss1*, *kiss2*) y dos *gpr54* (*gpr54-1b*, *gpr54-2b*) (Carrillo *et al.*, 2009; Felip *et al.*, 2009). Como se ha descrito en mamíferos, el papel de estos genes puede ser también crítico en la regulación del eje gonadotropo en peces. Con el objetivo de investigar la función que tienen los esteroides sexuales sobre la regulación del sistema kisspeptina y GnRH/gonadotropinas en el cerebro de machos y hembras adultos de lubina, se llevaron a cabo dos experimentos independientes basados en tratamientos de castración y administración de implantes con testosterona en el caso de machos y con 17 beta-estradiol en el caso de las hembras. Con esta finalidad, se realizaron análisis hormonales y moleculares para descifrar los mecanismos de retroalimentación negativa y/o positiva de los esteroides sexuales en el control de estos sistemas neuroendocrinos en la lubina.

## Material y Métodos

Durante la recrudescencia gonadal temprana de la lubina (índice gonadosomático, GSI <0,07% en machos y <0,77% en hembras) se llevaron a cabo dos experimentos independientes en machos (Experimento 1) y hembras (Experimento 2). Experimento 1; se establecieron tres grupos (n= 16-18 peces/grupo, 152,37 ± 0,58 g y 23,6 ± 9,07 cm) que se distribuyeron de la manera siguiente: machos intactos (con gónada) y con implantes vacíos (sin esteroides) que se consideró como el grupo control, machos gonadectomizados (GDX) que se implantaron con implantes que contenían testosterona (GDX+T) o con implantes vacíos (GDX-T). Experimento 2; se establecieron tres grupos (n= 8-12 peces/grupo, 1304,67 ± 114,13 g y 41,57 ± 1,59 cm) que se distribuyeron de la manera siguiente: hembras intactas (con gónada) y con implantes sin esteroides (grupo control), hembras ovariectomizadas (OVX) con implantes que contenían 17-beta estradiol (OVX+E<sub>2</sub>) o con implantes vacíos (OVX-E<sub>2</sub>). Todos los tratamientos de cirugía e implantación se llevaron a cabo previa anestesia de los animales. La extracción de las gónadas se llevó a cabo mediante una incisión abdominal de 4-5 cm y se suturó usando hilo de seda. Los implantes (0,1 mg/g pez) se administraron intraperitonealmente, 15-20 días después de la cirugía, a través de una incisión en la piel y el músculo de 2-3 cm (Fig. 1A-B). El día de la implantación se consideró como punto de inicio de cada experimento (día 0) tras el cual los animales se muestrearon periódicamente. Se obtuvieron muestras de plasma que se almacenaron a -20°C para posteriores análisis de esteroides sexuales en machos (T, E<sub>2</sub> y 11-ketotestosterona 11-KT) y hembras (T y E<sub>2</sub>). De forma paralela se realizaron sacrificios con el objetivo de extraer muestras de hipotálamo e hipófisis que se almacenaron a -80°C para posteriores análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real de los genes *kiss* y *gpr54* en el hipotálamo y de la subunidad beta de las gonadotropinas en la hipófisis.

## Resultados y Discusión

Los resultados del Exp. 1 muestran que los niveles plasmáticos de T en los machos GDX+T eran 7 veces superiores a los registrados en el grupo control, mientras que los niveles de T en los machos GDX-T se redujeron a la mitad de los registrados en el grupo control. En cuanto a la expresión hipotalámica de las kisspeptinas, los resultados mostraron que la expresión del *kiss2* era superior a la del *kiss1* (Fig 1C). En particular, la expresión del *kiss2* en los machos GDX-T se redujo casi a la mitad de la del grupo control, mientras que en los machos GDX+T la expresión del *kiss2* fue notablemente inferior (Fig. 1C). Aunque no se han observado diferencias significativas, los resultados obtenidos sugieren que la T ejerce una regulación a la baja del *kiss2* en el hipotálamo. Los niveles de expresión del *kiss1* en los machos GDX+T fue también inferior a la de los controles (Fig. 1C) aunque tampoco se detectaron diferencias significativas entre los grupos. A nivel de receptores, la expresión del *gpr54-2b* fue notablemente superior a la del *gpr54-1b* pero no se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (datos no mostrados). En el Exp. 2, los resultados mostraron que los niveles plasmáticos de E<sub>2</sub> en las hembras del grupo OVX+E<sub>2</sub> eran 5 veces superiores a los niveles detectados en el grupo control, mientras que los niveles de E<sub>2</sub> en las hembras OVX-E<sub>2</sub> eran similares a los de los controles. Actualmente se están llevando a cabo los análisis moleculares para conocer el efecto de la ovariectomía y el remplazamiento con E<sub>2</sub> sobre la expresión del sistema kisspeptina en el hipotálamo de hembras de lubina. Asimismo se están realizando los análisis para conocer el efecto de estas manipulaciones sobre la expresión de las gonadotropinas en la hipófisis y su relación con el sistema kisspeptina. Todos estos resultados nos permitirán dilucidar los mecanismos de retroalimentación negativa/positiva que ejercen los esteroides sexuales sobre los sistemas kisspeptina y GnRH/gonadotropinas en peces y compararlos con aquéllos descritos en otros vertebrados (Shibata *et al.*, 2007; Brown *et al.*, 2008).



**Figura 1.** (A) Tamaño de los implantes de T administrados a machos adultos de lubina (blancos con esteoide; grises vacíos). (B) Imagen ventral de un individuo GDX+T. (C) Efectos de la gonadectomía y el remplazamiento con T sobre la expresión hipotalámica de *kiss1* y *kiss2* determinados por qRT-PCR.

## Bibliografía

- Brown, R.E., S.A Imran y E.Ur.M. Wilkinson. 2008. KISS-1mRNA in adipose tissue is regulated by sex hormones and food intake. *Molecular and Cellular Endocrinology* 281: 64-72.
- Carrillo, M., S. Zanuy, A. Felip, M.J. Bayarri, G. Molés y A. Gómez. 2009. Hormonal and environmental control of puberty in perciform fish. The case of sea bass. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology: Annals of the New York Academic of Sciences*. 1163: 49-59.
- Felip, A., S. Zanuy, R. Pineda, L. Pinilla, M. Carrillo, M. Tena-Sempere y A. Gómez. 2009. Evidences for two distinct *KiSS* genes in non-placental vertebrates that codes kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 312: 61-71.
- Shibata, M., R.L Friedman, S. Ramaswamy y T.M. Plant. 2007. Evidence that down regulation of hypothalamic KISS-1 expression is involved in the negative feedback action of testosterone to regulate luteinising hormone secretion in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Journal of Neuroendocrinology* 19: 432-433.

## Agredecimientos

Trabajo financiado por AGL2009-11086 (MICINN) a A.F. M.V.A disfrutó de una beca FPI (MICINN).