

Efecto de la testosterona en la espermatogénesis de machos de dorada (*Sparus aurata* L.)

Miriam Sánchez-Hernández¹, Elena Chaves-Pozo¹, Isabel Cabas², Victoriano Mulero², Alfonso García-Ayala^{2*}, Alicia García-Alcázar¹

¹Centro Oceanográfico de Murcia, Instituto Español de Oceanografía (IEO), Carretera de la Azohía s/n. Puerto de Mazarrón, 30860 Murcia.

²Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Biología, Campus Regional de Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum", Universidad de Murcia, 30100 Murcia.

* correspondencia: agayala@um.es, tel.: +34-868884968, fax: +34-868883963

Resumen

Los andrógenos pueden inducir la espermatogénesis en peces teleósteos inmaduros. Sin embargo, su función no se conoce con exactitud en los ejemplares adultos. Para conocer el efecto *in vivo* de la testosterona (T) sobre la espermatogénesis de dorada (*Sparus aurata* L. 1758), especie hermafrodita protándrica de interés económico alto en la región de Murcia, inyectamos un implante (*in situ* forming microparticle system) a ejemplares que se encontraban en la etapa de involución testicular del segundo ciclo reproductor. Se trabajó con tres grupos de ejemplares: i) inyectados con implantes con 1 mg T/Kg de peso corporal, ii) inyectados con implantes sin T y iii) no inyectados. Se tomaron muestras de sangre, gónada e hígado a los 7, 14, 21 y 28 días después de haberlos inyectado para realizar un análisis hormonal, morfológico, inmunocitoquímico y de expresión génica. El objetivo de nuestro trabajo era determinar el efecto de la T, y de sus derivados, sobre la fisiología de la gónada analizando la progresión de la espermatogénesis, la tasa de proliferación celular y de apoptosis, la presencia de leucocitos y el perfil de expresión de genes relevantes en la respuesta inmunitaria. Los implantes con T provocaron un aumento en los niveles de T, alcanzando niveles supra-fisiológicos. El perfil de expresión génica, en gónada e hígado de algunas enzimas implicadas en la síntesis y el metabolismo de esteroides, descartó la transformación de T en compuestos estrogénicos. Por otra parte la T parece inhibir la respuesta inmunitaria en la gónada ya que observamos una disminución de los niveles de expresión de los genes que codifican para los TLR, lo que podría provocar una disminución de su capacidad para reconocer y responder a los patógenos. Sin embargo se observó un aumento de granulocitos acidófilos y linfocitos lo que nos sugiere que los andrógenos participan en el flujo migratorio de leucocitos al interior de la gónada.

Abstract

Androgens can induce complete spermatogenesis in immature or prepubertal teleost fish, however many aspects of the role of androgens in adult teleost spermatogenesis have remained elusive. We have used the an implant (*in situ* microparticle forming system) of testosterone (T) in a homogenous population of gilthead seabream at testicular involution stage to study *in vivo* the effects of T on the balance of the steroid hormones and on the physiology of the gilthead seabream gonad. We worked with three groups of specimens: i) injected with 1 mg T/kg body weight, ii) injected with implants without T and iii) non-injected. Blood samples, gonad and liver were taken at 7, 14, 21 and 28 days after they were injected for hormone analysis, and morphological, immunocytochemical and gene expression analysis. The aim of this study was to determine the effect of T, and its derivatives, on the physiology of the gonad analyzing the progression of spermatogenesis, the rate of cell proliferation and apoptosis, the presence of leukocytes and the expression profile of genes important in the immune response. T implants caused increase in the levels of T, reaching supra-physiological levels. The gene expression profile of some steroidogenic enzymes in liver and gonad ruled out the transformation of T. Moreover, T seems to inhibit the immune response in the gonad as partially impaired the ability to recognize and response to pathogens through down-regulation of several *tlr* gene expressions. However, there was an increase in the number of the acidophilic granulocytes and lymphocytes suggesting that androgens would also be involved in leukocytes migratory influx.

Palabras clave: *Sparus aurata*, leucocitos, testículo, andrógenos, enzimas esteroideogénicas

Introducción

Los andrógenos pueden inducir la espermatogénesis en teleósteos inmaduros (Miura et al. 1991, Cavaco et al. 1998, Campbell et al. 2003). Sin embargo, el papel exacto que los andrógenos tienen en peces maduros es desconocido. Los andrógenos (testosterona, T, y 11-cetotestosterona, 11KT) son esenciales en la diferenciación sexual y la espermatogénesis a través de la unión al receptor de andrógenos (AR), el cual puede activar o inhibir la expresión de genes específicos (Borg, 1994, Devlin & Nagahama 2002, Leet et al. 2011). Los niveles de T incrementan, tanto en machos como en hembras, durante el desarrollo de la gónada mientras que la 11KT es el principal andrógeno activo en machos (Borg 1994). Otros derivados de la T, como la 11 β -hydroxytestosterona (OHT) o dihidrotestosterona (DHT), con un potencial androgénico alto, han sido detectados en especies cultivadas (Borg 1994, Margiotta-Casaluci & Sumpter 2011). Por otra parte, la T es un andrógeno aromatizado, que puede ser transformado en 17 β -estradiol (E₂), mientras que la DHT es un andrógeno no aromatizado, que se puede transformar también en 5 α -androstano-3 β , 17 β -diol (β -diol) (Mouriec et al. 2009), un compuesto estrogénico que estimula la actividad transcripcional de los receptores de estrógenos (ERs) de mamíferos (Kuiper et al. 1998). La gónada es el órgano principal en el que se produce la síntesis *de novo* de esteroides, biológicamente activos (Stocco 2001), mientras que el hígado es un órgano donde se metabolizan los esteroides (Arukwe 2008). En ambos tejidos, tanto la síntesis *de novo* como el metabolismo de las hormonas esteroideas, son controlados por cambios rápidos en las actividades de las enzimas esteroideogénicas, así como por la disponibilidad del sustrato, o por los cambios en las cantidades de las enzimas esteroideogénicas por medio de la regulación de la cantidades de los ARN mensajeros (ARNm) específicos que las codifican (Miller 1989).

La dorada es un teleósteo marino hermafrodita protándrico de puesta estacional. Durante sus dos primeros ciclos reproductores (CR), los ejemplares son machos, presentando una gónada con dos áreas bien diferenciadas: un área testicular funcional y un área ovárica no funcional. Su CR se divide en cuatro etapas: espermatogénesis, puesta, post-puesta y quiescencia o involución testicular durante el primer ciclo y el segundo ciclo, respectivamente (Chaves-Pozo et al. 2005a, Liarte et al. 2007). Tras la puesta, los testículos sufren cambios morfológicos abruptos, los cuales incluyen una infiltración masiva de granulocitos acidófilos (AGs), un tipo de célula inmunitaria esencial para la fisiología de la gónada y cuya presencia en la gónada es regulada por factores específicos de la gónada así como por factores hormonales (Chaves-Pozo et al. 2003, 2005a,b, Liarte et al. 2007). Así se ha comprobado que existe una correlación entre los niveles de estradiol (E₂) y la migración hacia la gónada de AGs (Chaves-Pozo et al. 2008a, 2010). Así mismo se ha comprobado que el E₂ exógeno o el 17 α -etinilestradiol (EE₂) aceleran el final de la espermatogénesis así como provocan un aumento del flujo de leucocitos hacia la gónada a través de la regulación de genes involucrados en la migración de los leucocitos (Chaves-Pozo et al. 2003, 2008a,b, Liarte et al. 2007, Cabas et al. 2011).

Con todas estas observaciones previas, nuestro objetivo era ver la función de la T exógena tanto sobre el balance de hormonas esteroideas como sobre la fisiología de la gónada en una población homogénea de machos de dorada. Para ello usamos un implante de T basado en el sistema de formación de micropartículas *in situ* (ISM), el cual libera la hormona y no produce daños fisiológicos en la dorada (Castillo-Briceño et al. 2013).

Material y métodos

Diseño experimental

Los ejemplares de dorada, sexualmente maduros, en la fase de espermatogénesis del segundo CR fueron criados y mantenidos en el Centro Oceanográfico de Murcia (IEO, Mazarrón, Murcia). Los peces estuvieron en tanques de 2 m³ con un rango de temperatura entre 15°C-18°C, flujo de agua constante, con sistema de aireación y filtración adecuados y fotoperiodo natural. Ejemplares macho fueron separados y aclimatados durante 30 días. Se hicieron 3 grupos experimentales: i) peces inyectados con el implante sin T (control), ii) peces inyectados con T (T-ISM) y iii) peces no inyectados. Cada grupo tenía una n=26.

Los ejemplares fueron alimentados *ad libitum* 3 veces al día durante 28 días. Se realizaron 4 muestreos a los 7, 14, 21 y 28 días después de inyectar el implante (dpi). En cada muestreo se anestesiaron 6 individuos de cada grupo con 40 µl/l de aceite de clavo. La sangre se obtuvo mediante punción caudal con jeringuillas heparinizadas. Las muestras de plasma se obtuvieron por centrifugación (10.000g 5 minutos) y fueron inmediatamente congeladas y guardadas a -80°C. Los animales fueron decapitados y se tomaron datos de su peso corporal así como del peso de la gónada y del hígado antes de procesarlos para el análisis de expresión de genes. La gónada también fue procesada para su estudio microscópico óptico.

Los experimentos descritos cumplen con las directrices del Consejo de la Unión Europea (86/609/EU), el Comité de Bioética de la Universidad de Murcia (España) y el Instituto Español de Oceanografía (España) para el uso de animales de laboratorio.

Formación de los implantes por micropartículas in situ (ISM)

Los implantes ISM ya se habían utilizado anteriormente en la dorada (Castillo-Briceño et al. 2013). Las soluciones del polímero se prepararon mediante la mezcla de poli-D, L-lactato de PLGA-coglicolato (P2066-1G, Sigma) con el disolvente 2-pirrolidona (Fluka analítica) 20% (w / w). La T (Sigma) se disolvió en solución de polímero 10% (w / w) y los implantes ISM se prepararon mediante la emulsión de la solución de polímero con T en aceite de cacahuete (fase de aceite externo) (0,1:1) en un baño de sonicación (Ultrasons 3.000.512, P Selecta) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al implante se le añadió Pluronic F127 (Sigma) (1%, w / w, acorde a la cantidad de la formulación total) y monoestearato de aluminio (Fluka analítica) (2%, w / w, acorde a la fase de aceite) para aumentar la estabilidad de las emulsiones. Los implantes T-ISM se prepararon con 1 mg de T / kg de peso corporal. Los T-ISM y los ISM se colocaron mediante una inyección intramuscular, aproximadamente 2 cm por debajo de la aleta dorsal, esperando alcanzar concentraciones plasmáticas suprafisiológicas de T (Chaves et al. 2008a).

Índices gonadosomático y hepatosomático

El índice gonadosomático (IGS) se calculó como un indicador del estado reproductor de los individuos y el índice hepatosomático (IHS) como un indicador de la toxicidad del tratamiento. Los índices se calcularon mediante las siguientes fórmulas:

$$GSI = 100 \cdot (MG/MB) (\%)$$

$$HSI = 100 \cdot (MH/MB) (\%)$$

Siendo MG, la masa de la gónada, MH, la masa del hígado, y MB la masa del pez, todas ellas en gramos.

Métodos analíticos

La determinación de hormonas esteroideas en plasma y en tejidos se realizó mediante ELISA siguiendo el método previamente descrito (Chaves-Pozo et al. 2008a, 2010). Los esteroides fueron extraídos de 1-2 µl de plasma en tampón de lisis (tampón fosfato 50 mM con DTT 10 mM (Sigma) y sacarosa 250 mM (Sigma).

Los esteroides (T, 11KT y E₂), el anticuerpo monoclonal anti-IgG (mAb), los anticuerpos específicos anti-esteroides y los trazadores enzimáticos (esteroides conjugados con acetilcolinesterasa) se obtuvieron de Cayman Chemical. Las placas de 96 pocillos de microtitulaciones (MaxiSorp) se obtuvieron de Nunc.

La curva patrón fue establecida en todos los ensayos con unas concentraciones de 6.13 x 10⁻⁴ a 5 ng/ml (0.03-250 pg/pocillo). Tanto los estándares como los extractos de las muestras se pusieron por duplicado. El límite de detección inferior del ensayo fue de 24.4 pg/ml. Los coeficientes de variación intra-ensayo (calculado de los duplicados de las muestras) fueron 13.2 ± 2.3% para T, 12.6 ± 2.4% para 11KT and 6.2 ± 1.2% para E₂.

Microscopía óptica e inmunocitoquímica

Las gónadas fueron fijadas en una solución de Bouin o paraformaldehído 4%, incluidas en parafina (Paraplast Plus; Sherwood Medical, Athy, Ireland) y cortadas en secciones de 5µm. Las secciones se utilizaron para técnicas de inmunocitoquímica indirecta usando 3 anticuerpos monoclonales

(mAbs) específicos: i) para AGs de dorada (G7) (Sepulcre et al. 2002) y ii) inmunoglobulina M (IgM, Aquatic Diagnostic) para detectar linfocitos B. Las diluciones óptimas fueron de 1:100, 1:250 or 1:1000, respectivamente (García-Ayala & Chaves-Pozo 2012). Todas las secciones fueron examinadas al microscopio óptico Axiolab (Zeiss).

Análisis de expresión de genes

El ARN total fue extraído de fragmentos de gónada con TRizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo del reactivo. Se hicieron 2 pool de 3 peces por grupo y tiempo de muestreo con la misma cantidad de ARN. Se trataron con DNasa I (1 unidad/ μ g ARN). Para la síntesis cDNA se utilizó SuperScript III RNase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen) y para la síntesis de la primera cadena de cDNA usamos como cebador oligo-dT18 para 1 μ g de ARN total a 50 °C durante 60 min.

La expresión de los genes que codifican para receptores de reconocimiento de patógenos (tlr5s y tlr9) se analizaron por PCR a tiempo real con ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) usando SYBR Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems) como está descrito previamente (Chaves-Pozo et al. 2008b). Para cada ARNm la expresión fue corregida con la expresión del gen ribosómico de la proteína S18 gene (rsp18) de cada muestra.

Análisis estadísticos

Todos los datos fueron analizados mediante ANOVA usando para determinar las diferencias entre grupos el test post hoc de Tukey. La normalidad de los datos se comprobó previamente con el test de Shapiro-Wilk y para comprobar la homogeneidad de las varianzas se utilizó el test de Levene. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Statgraphics 15.0 (StatPoint, Inc). Todos los datos se representan con la media y el error estándar de la misma (sem). El nivel de significancia (P) se fijó en 0.1 ($P < 0.1^*$; $P < 0.05^{**}$; $P < 0.01^{***}$).

Resultados

Influencia de la testosterona en el balance hormonal

Los individuos control (implantados sin T) no presentaron cambios significativos ni en la morfología de la gónada, ni en los niveles hormonales, ni en el IGS o IHS con respecto a los individuos no inyectados. Sin embargo, los individuos implantados con T (Tabla 1) presentaron un incremento tanto del IGH como del IHS con respecto a los ejemplares control.

Con respecto a los niveles hormonales en plasma pudimos ver un aumento supra fisiológico de T en los individuos implantados con T a los 7dpi y estos valores fueron disminuyendo a lo largo del experimento aunque siempre se mantuvieron superiores a los del grupo control (Fig. 1a). Sin embargo, la 11KT sólo disminuyó significativamente al finalizar el ensayo (Fig. 1b) mientras que el descenso de los niveles de estradiol se mantuvo durante todo el ensayo (Fig. 1c).

Tabla 1. Índice gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS) de los individuos no inyectados, control (ISM sin T) y peces implantados con T-ISM. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos según el test de Tukey.

		Días Post-implante			
		7	14	21	28
IGS (%)	Control	0.43 \pm 0.09 ^a	0.51 \pm 0.05 ^a	0.60 \pm 0.1 ^a	0.58 \pm 0.1 ^a
	T-ISM	0.53 \pm 0.1 ^a	1.83 \pm 0.9 ^b	0.51 \pm 0.1 ^a	0.4 \pm 0.03 ^a
IHS (%)	Control	1.27 \pm 0.1 ^a	1.20 \pm 0.1 ^a	1.24 \pm 0.1 ^a	1.42 \pm 0.1 ^a
	T-ISM	1.48 \pm 0.1 ^b	1.38 \pm 0.1 ^b	1.60 \pm 0.2 ^b	1.30 \pm 0.1 ^a

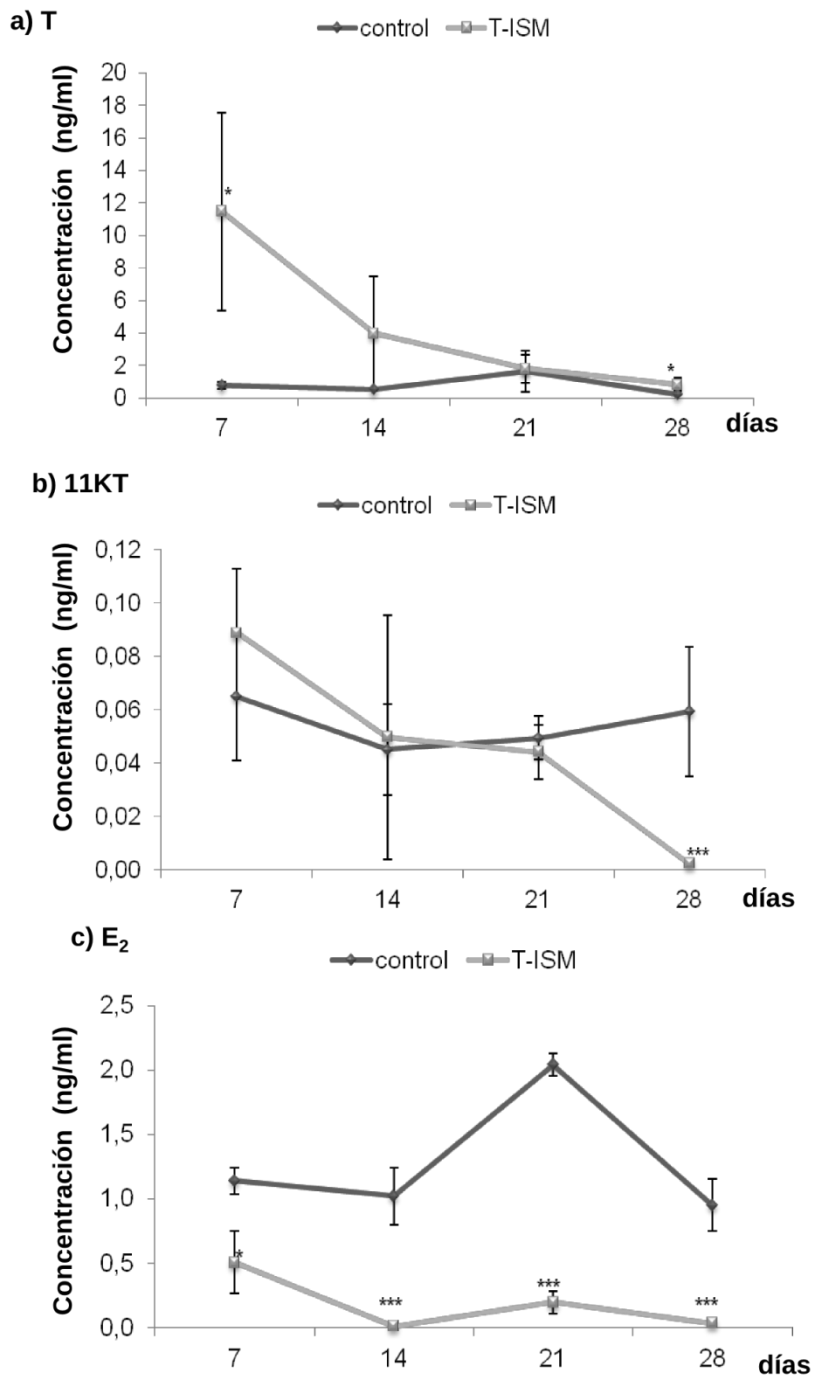


Figura 1. Niveles de las hormonas sexuales esteroideas en el plasma de individuos control (ISM sin T) e implantados con T-ISM. Los datos representan la media \pm S.E.M de 6 ejemplares/grupo. Asteriscos indican diferencias significativas comparadas con el grupo control (* $P \leq 0,1$, ** $P \leq 0,05$, *** $P \leq 0,01$).

Influencia de la testosterona en la fisiología de la gónada

Los implantes T-ISM provocaron un flujo de leucocitos hacia la gónada y, además, modificaron la expresión de genes que codifican para varias moléculas implicadas en el flujo de leucocitos hacia la gónada. El número de células G7⁺ (AGs; Fig. 2a) e IgM⁺ (linfocitos B; Fig. 2b) aumentaron en la zona testicular de los peces con el implante T-ISM peces a los 21 y 14 y a los 21 y 28 dpi, respectivamente.

Por otra parte, los niveles de transcripción de los receptores de reconocimiento de patógenos en la gónada *tlr5s* (Fig. 3a) y *tlr9* (Fig. 3b) incrementaron a los 7 y 14 dpi y disminuyeron a los 21 y 28 dpi.

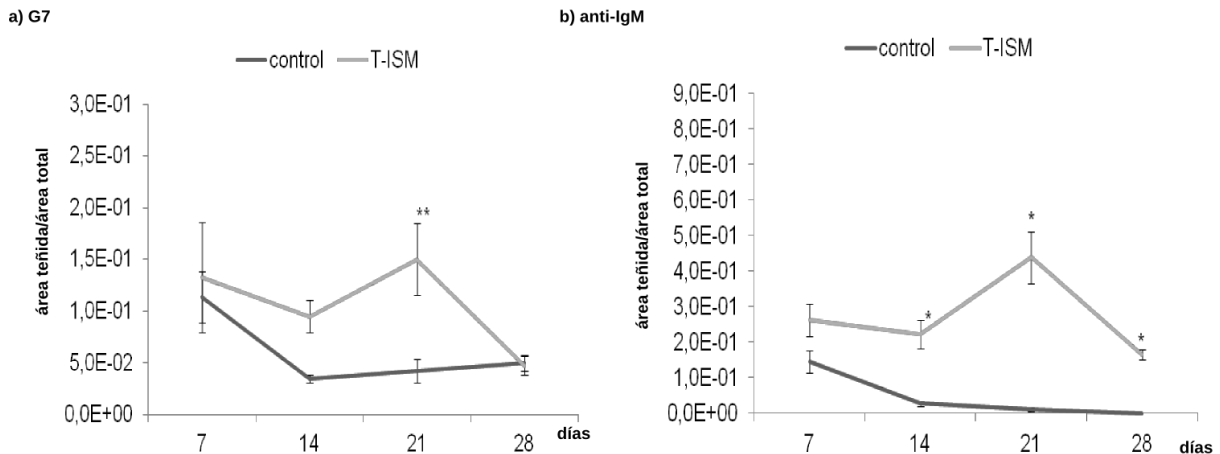


Figura 2. Cuantificación del número de linfocitos en la gónada de individuos control (ISM sin T) e implantados con T-ISM. Los datos representan la media \pm SEM del área teñida entre el área total de las secciones analizadas de 6 peces/grupo. Diferentes letras indican diferencias significativas entre grupos según el test de Tukey (*P \leq 0,1, **P \leq 0,05).

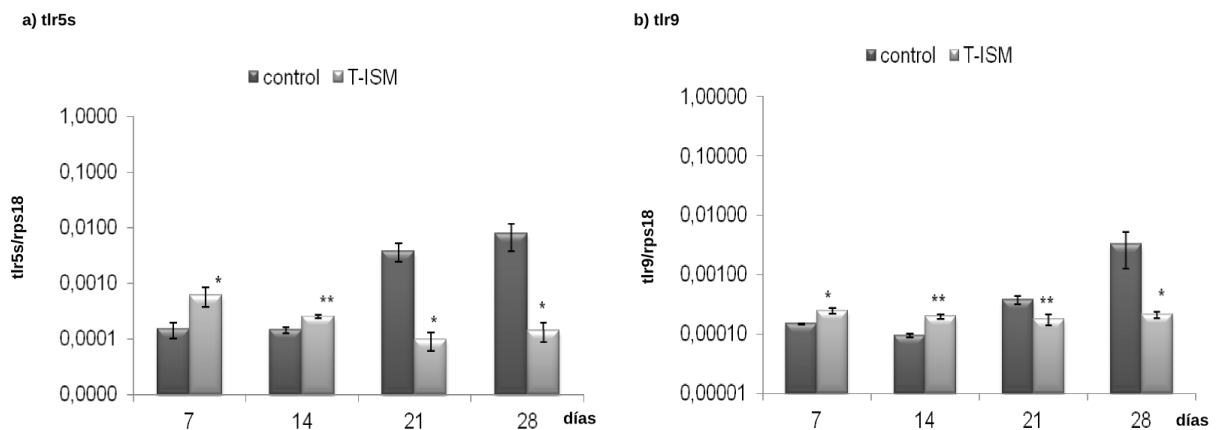


Figura 3. Expresión de los genes *tlr5s* (a) and *tlr9* (b) en la gónada de individuos control (implante ISM sin T) o individuos implantados con T-ISM. Los niveles de ARNm fueron estudiados real-time qRT-PCR. Los datos representan la media \pm S.E.M. de duplicados de las muestras correspondientes a dos pulls independientes con la misma cantidad de ARNm de 3 peces (n=6 peces/grupo). Asteriscos indican diferencias significativas comparadas con el grupo control (*P \leq 0,1, **P \leq 0,05, ***P \leq 0,01).

Discusión

Castillo-Briceño et al. (2013) demostraron la viabilidad de los implantes ISM para proporcionar hormonas sexuales esteroideas exógenas en los ejemplares de dorada. Del mismo modo se corroboró que los implantes ISM, por sí solos, apenas modifican los niveles de hormonas esteroideas sexuales y tampoco modificaron el IGS, el IHS ni la morfología testicular. En nuestro estudio, cuando los implantes T-ISM se implantaron en doradas en una etapa de involución testicular, la T alcanzó niveles supra-fisiológicos mientras que los niveles de E₂ descendieron por debajo de los fisiológicos y los niveles de 11KT disminuyeron sólo al final del experimento. Los implantes T-ISM promovieron un fuerte aumento de los niveles de T plasmáticos.

Cuando nos fijamos en la migración de leucocitos en la gónada, los resultados de estudios previos indican que el E₂ es el factor principal que desencadena esta afluencia por quimioquinas y moléculas de adhesión en las células endoteliales y macrófagos (Chaves-Pozo et al. 2007, Liarte et al. 2011a,b). Nuestros datos determinaron que la migración de los leucocitos también puede ser regulada por andrógenos probablemente por medio de algunas citoquinas pro-inflamatorias tales como la Il1b. Además pudimos observar que los implantes T-ISM disminuyeron la expresión génica de tlr5s y tlr9 que afectan a la capacidad de la gónada para reconocer y responder a los patógenos. Aunque los andrógenos parecen deprimir la respuesta inmunitaria de los vertebrados (Cutolo et al. 2005), en dorada, nuestros datos en la gónada, y los datos anteriores, en riñón cefálico, determinaron que los andrógenos aumentan o disminuyen la respuesta inmunitaria en función de la actividad analizada (Águila et al. 2013, Castillo-Briceño et al. 2013).

En conclusión, nuestro diseño experimental nos permitió aumentar los niveles de T a dosis supra-fisiológicas que fue acompañado por una disminución de los niveles de E₂ y el mantenimiento de la 11KT, principal andrógeno en peces, en concentraciones fisiológicas. La aparición de la migración de leucocitos hacia el testículo indica una compleja regulación de este proceso ya que se produce una disminución de la expresión de genes que codifican para citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión celular. La T en la gónada reduce, parcialmente, la capacidad de reconocer y dar respuesta a los agentes patógenos a través de los TLRs.

Agradecimientos

Damos las gracias al Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia por su ayuda con la PCR en tiempo real y al Dr. C. Kim (Universidad de Stirling) por el anti-IgM mAb. Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Séneca (CARM, proyecto 04538/GERM/06), Ministerio de Ciencia e Innovación (proyecto AGL2010-20801-C02-01, AGL2011-30264-C02-01, RYC-2009-05.451) y el Instituto Español de Oceanografía (subvención a MSH).

Referencias

- Águila S, Castillo-Briceño P, Sánchez-Hernández M, Cabas I, García-Alcázar A, Meseguer J, Mulero V & García-Ayala A. 2013. Specific and non-overlapping functions of testosterone and 11-ketotestosterone in the regulation of professional phagocyte responses in the teleost fish gilthead seabream. *Molecular Immunology*. 53(3): 218-226.
- Arukwe A. 2008. Steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cholesterol side-chain cleavage (P450_{scc})-regulated steroidogenesis as an organ-specific molecular and cellular target for endocrine disrupting chemicals in fish. *Cell Biology and Toxicology*. 24(6): 527-540.
- Borg B. 1994. Androgens in teleost fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 109 C(3): 219-245.
- Cabas I, Chaves-Pozo E, García-Alcázar A, Meseguer J, Mulero V & García-Ayala A. 2011. Dietary intake of 17alpha-ethinylestradiol promotes leukocytes infiltration in the gonad of the hermaphrodite gilthead seabream. *Molecular Immunology*. 48(15-16): 2079-2086.
- Castillo-Briceño P, Águila-Martínez S, Liarte S, García-Alcázar A, Meseguer J, Mulero V & García-Ayala A. 2013. In situ forming microparticle implants for delivery of sex steroids in fish: Modulation of the immune response of gilthead seabream by testosterone. *Steroids* 78: 26-33
- Cavaco JE, Vilroxx C, Trudeau VL, Schulz RW & Goos HJ. 1998. Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish (*Clarias gariepinus*). *American Journal of Physiology*. 275(6 Pt 2): R1793-1802.
- Chaves-Pozo E, Pelegrín P, Mulero V, Meseguer J & García-Ayala A. 2003. A role for acidophilic granulocytes in the testis of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L., Teleostei). *Journal of Endocrinology*. 179(2): 165-174.

- Chaves-Pozo E, Mulero V, Meseguer J & García-Ayala A. 2005a. An overview of cell renewal in the testis throughout the reproductive cycle of a seasonal breeding teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Biology of Reproduction*. 72(3): 593-601.
- Chaves-Pozo E, Mulero V, Meseguer J & García-Ayala A. 2005b. Professional phagocytic granulocytes of the bony fish gilthead seabream display functional adaptation to testicular microenvironment. *Journal of Leukocyte Biology*. 78(2): 345-351.
- Chaves-Pozo E, Liarte S, Vargas-Chacoff L, García-López A, Mulero V, Meseguer J, Mancera J.M & García-Ayala A. 2007. 17Beta-estradiol triggers postspawning in spermatogenically active gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) males. *Biology of Reproduction*. 76(1): 142-148.
- Chaves-Pozo E, Liarte S, Fernández-Alacid L, Abellán E, Meseguer J, Mulero V & García-Ayala A. 2008a. Pattern of expression of immune-relevant genes in the gonad of a teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Molecular Immunology*. 45(10): 2998-3011.
- Chaves-Pozo E, Arjona FJ, García-López A, García-Alcázar A, Meseguer J & García-Ayala A. 2008b. Sex steroids and metabolic parameter levels in a seasonal breeding fish (*Sparus aurata* L.). *General and Comparative Endocrinology*. 156: 531-536.
- Chaves-Pozo E, Liarte S & García-Ayala A. 2010. Immune and reproductive interaction: An essential clue for understanding gonad functions in gilthead seabream, En *Recent advances in fish reproductive biology*. (García-Ayala A, Meseguer J, Chaves-Pozo E., eds). Kerala: Research Signpost pp. 127-139.
- Cutolo M, Capellino S, Montagna P, Ghiorzo P, Sulli A & Villaggio B. 2005. Sex hormone modulation of cell growth and apoptosis of the human monocytic/macrophage cell line. *Arthritis Research and Therapy*. 7(5): R1124-1132.
- Devlin RH & Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191-364.
- García-Ayala A & Chaves-Pozo E. 2012. Immunocytochemical tools reveal a new research field between the boundaries of immunology and reproductive biology in teleosts. En *Applications of immunocytochemistry* (H. Dehghani, ed.). InTech, Rijeka pp. 135-158.
- Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I & Gustafsson JA. 1998. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 19(4): 253-286.
- Leet JK, Gall HE & Sepulveda MS. 2011. A review of studies on androgen and estrogen exposure in fish early life stages: effects on gene and hormonal control of sexual differentiation. *Journal of Applied Toxicology*. 31(5): 379-398.
- Liarte S, Chaves-Pozo E, García-Alcázar A, Mulero V, Meseguer J & García-Ayala A. 2007. Testicular involution prior to sex change in gilthead seabream is characterized by a decrease in DMRT1 gene expression and by massive leukocyte infiltration. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 5: 20-35.
- Liarte S, Chaves-Pozo E, Abellán E, Meseguer J, Mulero V & García-Ayala A. 2011a. 17beta-Estradiol regulates gilthead seabream professional phagocyte responses through macrophage activation. *Developmental and Comparative Immunology*. 35: 19-27.
- Liarte S, Cabas I, Chaves-Pozo E, Arizcun M, Meseguer J, Mulero V & García-Ayala A. 2011b. Natural and synthetic estrogens modulate the inflammatory response in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) through the activation of endothelial cells. *Molecular Immunology*. 48(15-16): 1917-1925.
- Margiotta-Casaluci L & Sumpter JP. 2011. 5alpha-Dihydrotestosterone is a potent androgen in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *General and Comparative Endocrinology*. 171(3): 309-318.
- Miller WL. 1989. Regulation of mRNAs for human steroidogenic enzymes. *Endocrine Research*. 15(1-2): 1-16.
- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H & Nagahama Y. 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 88(13): 5774-5778.
- Mouriec K, Gueguen MM, Manuel C, Percevault F, Thieulant ML, Pakdel F & Kah O. 2009. Androgens upregulate cyp19a1b (aromatase B) gene expression in the brain of zebrafish (*Danio rerio*) through estrogen receptors. *Biology of Reproduction*. 80(5): 889-896.
- Sepulcre MP, Pelegrín P, Mulero V & Meseguer J. 2002. Characterization of gilthead seabream acidophilic granulocytes by a monoclonal antibody unequivocally points to their involvement in fish phagocytic response. *Cell and Tissue Research*. 308(1): 97-102.
- Stocco DM. 2001. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual of Review of Physiology*. 63: 193-213.