Fisiologia della riproduzione dei pesci teleostei

DETERMINAZIONE DEL SESSO E DIFFERENZIAZIONE GONADALE NEI PESCI

Ci sono specie a sessi separati (spigola) mentre altre sono ermafrodite proterandre (Orata e Sarago pizzuto), proterogine (cernie e molti Labridi) o simultanee (molte specie del gen. *Serranus*). Ad esempio l'orata è un ermafrodita proterandro in cui i maschi vanno incontro ad inversione sessuale diventando femmine, inoltre in cattività l'inversione sessuale è condizionata da fattori sociali ed ormonali che possono portare ad un rapporto fra i sessi sfavorevole se non attentamente considerato nel formare i gruppi di riproduttori. È pertanto fondamentale controllare ad ogni stagione riproduttiva il rapporto fra i sessi nelle vasche, ed operare nel periodo di riposo sessuale sui fattori ambientali e sociali che influenzano il cambiamento di sesso, per ottenere un corretto rapporto maschi/femmine nel periodo riproduttivo.

Determinazione del sesso

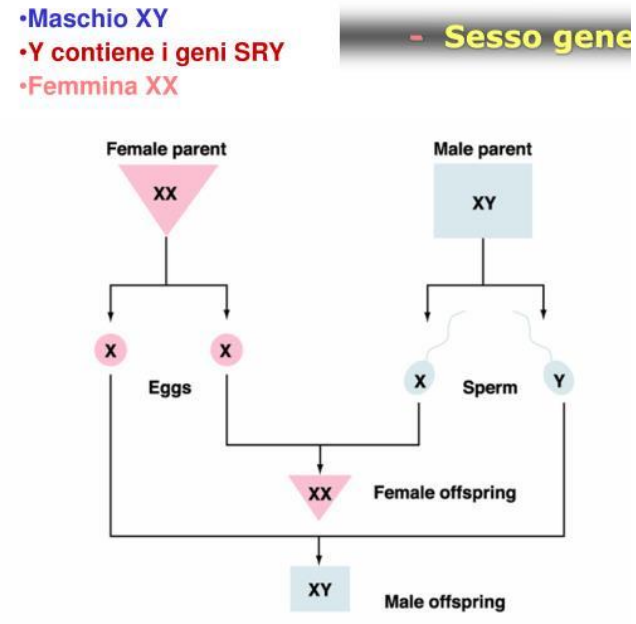
GENETICA

FATTORI AMBIENTALI (TEMPERATURA (TDS); pH, fotoperiodo, etc)

DIPENDENTE DAL COMPORTAMENTO (BDS)

GENETICA

In generale i geni coinvolti nella determinazione del sesso possono essere distribuiti lungo tutto il genoma (controllo poligenico del sesso), localizzati in un singolo cromosoma sessuale che può essere, o meno, influenzato da fattori sessuali sugli autosomi.

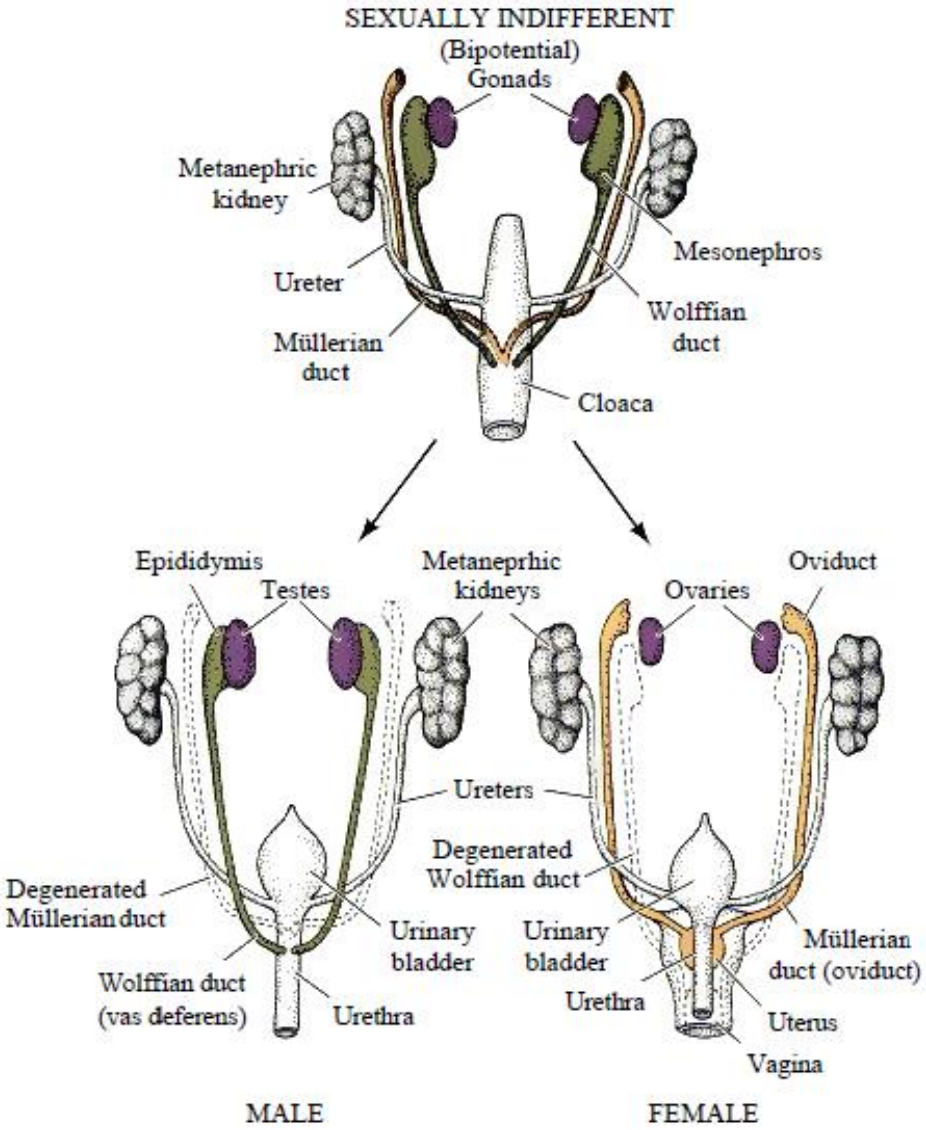


Sex Determination

- ZZ – ZW sex determination
  - Birds; some fish and amphibians
  - ZW – female
    - Heterogametic
    - Female determines sex of offspring
  - ZZ – male
    - homogametic

I cromosomi sessuali, nei pesci, sono stati individuati solo nel 10% delle specie finora caratterizzate citogeneticamente. Esistono due sistemi di cromosomi sessuali: il sistema eterogametico XY, simile a quello dei mammiferi, con il fattore determinante il sesso maschile sul cromosoma Y, ed il sistema ZW, in cui il fattore determinante il sesso femminile è sul cromosoma W, quindi ZW è una femmina mentre ZZ è un maschio.

DIFFERENZIAMENTO SESSUALE



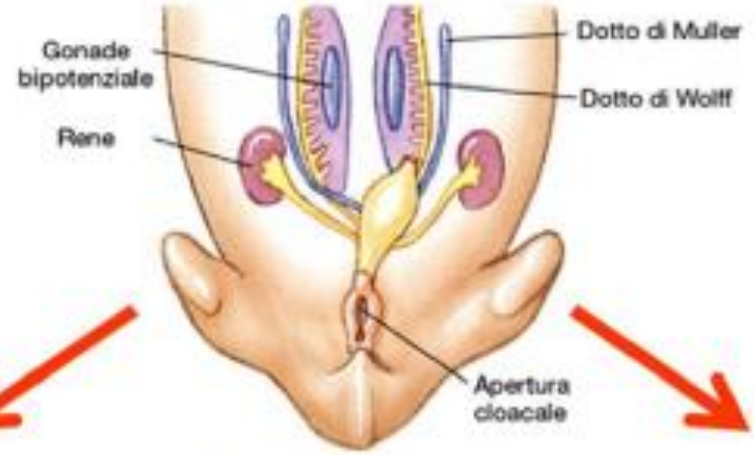
Lo sviluppo dell'embrione in senso maschile o femminile dipende dalla presenza o dall'assenza del "fattore di determinazione testicolare" (TDF) una proteina zinc-finger prodotta dal gene SRY (Sex-determining Region Y).

SRY è membro della famiglia dei geni SOX (*SRY-like-box*) i quali codificano per proteine leganti il DNA.

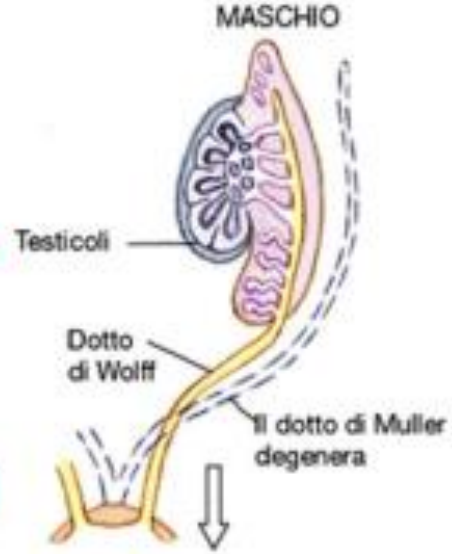
TDF agisce quale fattore di trascrizione che determina il differenziamento della gonade in senso maschile durante lo sviluppo embrionale nei mammiferi.

Il differenziamento sessuale inizia nell'embrione alla VII settimana di sviluppo

Sviluppo delle Gonadi

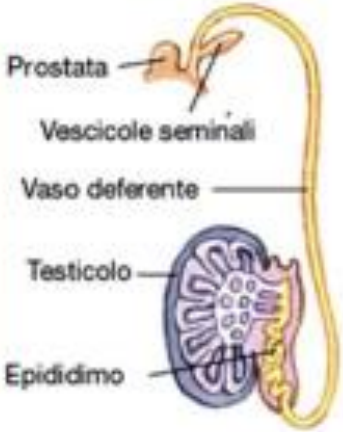


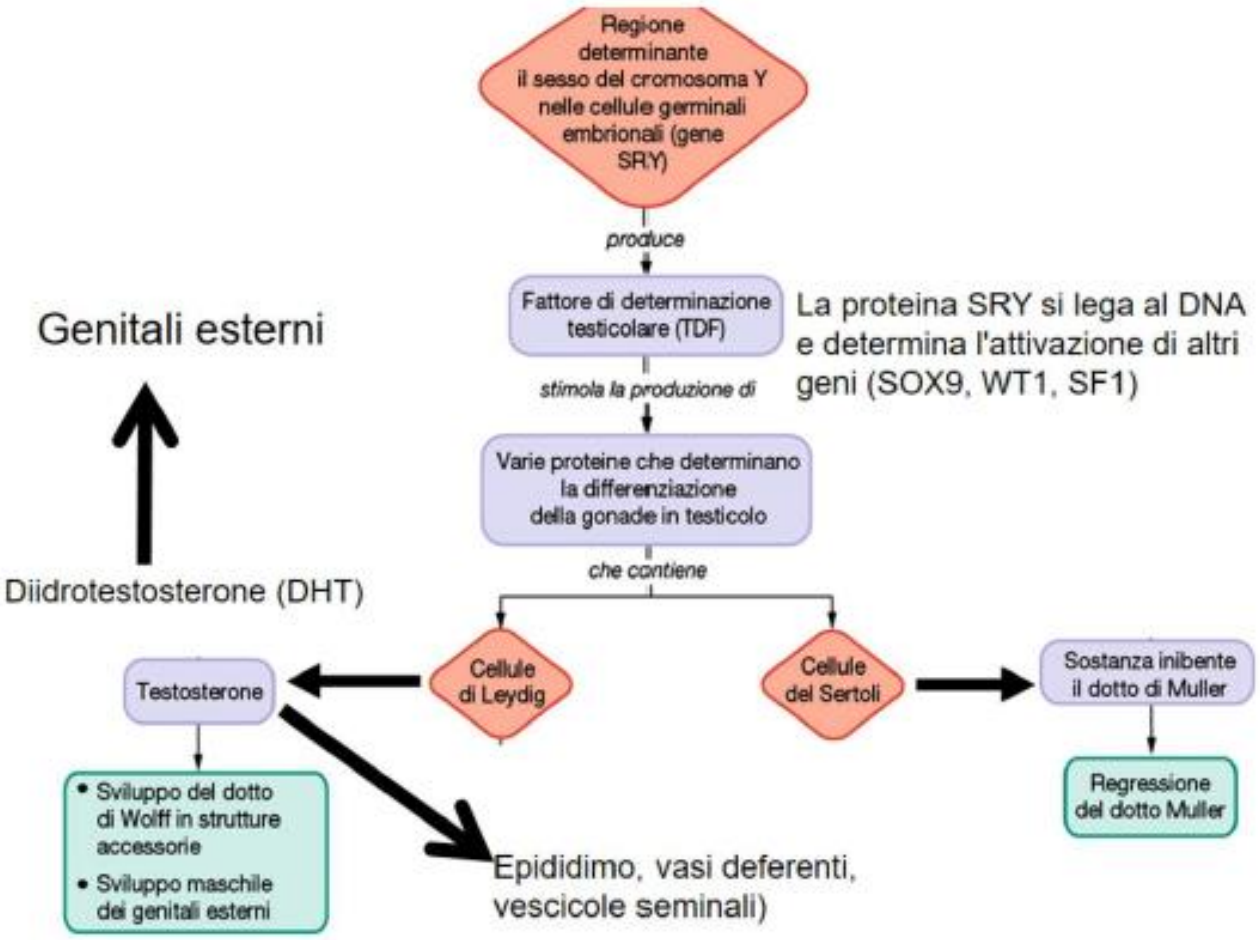
Stadio bipotenziale
Alla sesta settimana gli organi riproduttivi hanno la potenzialità di svilupparsi in strutture maschili o femminili



L'assenza di AMH permette alla gonade di trasformarsi nelle strutture femminili. Il dotto di Wollf degenera

La proteina SRY indirizza la gonade a trasformarsi nei testicoli che producono testesterone e AMH che provoca la degenerazione del dotto di Muller





La recente scoperta del gene DMY (DM-domain gene on the Y chromosome) in medaka fish (*Oryzias latipes)* suggerisce la possibilità che nei pesci la differenziazione delle gonadi possa essere ereditata anche con modalità simili a quelle dei mammiferi. DMY è un gene di determinazione testicolare, considerato essere l'equivalente del gene SRY dei mammiferi

Controllo ambientale della determinazione e differenziazione sessuale

Tra i principali fattori ambientali che influenzano il processo di determinazione del sesso ci sono: fattori fisici (temperatura, pH, ecc.), le interazioni sociali, i composti endocrini naturali e gli inquinanti ambientali. La temperatura, ed in particolar modo le fluttuazioni di temperatura, anche solo di 5-6 ° C, che le larve possono affrontare, durante il loro sviluppo ha effetto sulla determinazione del sesso. Tale effetto temperatura-dipendente si pensa possa essere attribuibile all'influenza sull'attività aromatasica e sulla sintesi di estradiolo. Gli inquinanti possono determinare parziale o totale inversione sessuale, sviluppo di gonadi intersessuali finanche la completa distruzione del fenotipo sessuale.

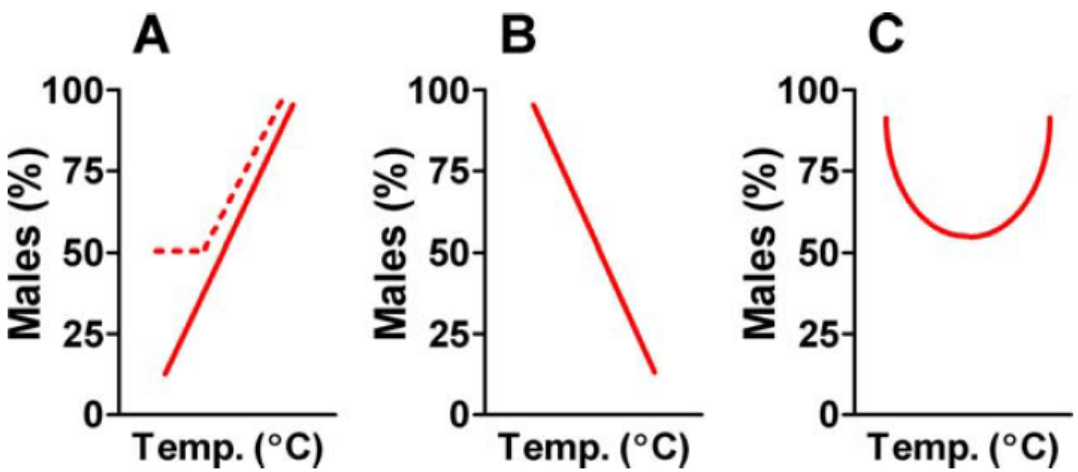


Figure 1. Patterns of temperature-dependent sex determination (TSD) in fish that had been recognized to date. They are defined according to the sex ratio produced as a function of temperature during the thermosensitive period. **A**, Pattern 1, low temperatures produce female-biased sex ratios and high temperatures produce male-biased sex ratios. **B**, Pattern 2, low temperatures produce male-biased sex ratios and high temperatures produce female-biased sex ratios. **C**, Pattern 3, male-biased sex ratios are produced at low and high temperatures, while balanced sex ratios are produced at intermediate temperatures. In some cases, the response may be partial (dashed line in A). The present study demonstrates that fish species with TSD only exhibit pattern 1.
doi:10.1371/journal.pone.0002837.g001

NEI PESCI TELEOSTEI la determinazione sessuale è un processo complesso, influenzato da variabili genetiche ed ambientali.

La formazione di gonadi funzionali avviene attraverso differenti tappe:

1) La differenziazione precoce degli elementi germinali dai blastomeri totipotenti (cellule germinali primordiali, PGCs);

2) La formazione delle creste germinali (gonadi primordiali);

3) La migrazione delle cellule germinali primordiali nelle creste germinali.

Formazione delle cellule germinali primordiali (PGCs)

In many organisms, the unfertilized egg has been shown to contain specialized granular cytoplasm that is often found in vegetal regions of the egg, and cells developing around this material remain undifferentiated and physically separated from most early developmental events. These special cells subsequently develop into primordial germ cells (PGCs), which ultimately form gamete-forming cells within the gonad.

The cytoplasmic substances responsible for inducing PGC development have not been fully defined as yet, but appear to be specialized maternally deposited RNAs encoded by maternal genes involved in PGC formation.
Granular cytoplasmic inclusions (nuage) have been identified in PGCs of teleosts .

Indeed, in zebrafish, DNA-helicase RNA (encoded by the vas gene) becomes concentrated along cleavage planes at the two-cell stage of embryogenesis, and remains exclusively associated with four cells (putative PGCs)
After embryogenesis, vas expression in zebrafish and tilapia can be detected only in germ cells in the developing gonad

FORMAZIONE DELLE CRESTE GERMINALI (GONADI PRIMORDIALI) E MIGRAZIONE DELLE CELLULE GERMINALI PRIMORDIALI NELLE CRESTE GERMINALI.

A differenza dei mammiferi, nei pesci le **PGC** non proliferano o proliferano poco durante la migrazione verso lo strato gonadale.

Le **PGC** iniziano a proliferare dopo che esse hanno raggiunto lo strato gonadale, comunque il momento della ripresa dell'attività proliferativa è specie-specifica.

Dopo la proliferazione delle **PGC** gonadali, segue la fase di differenziazione sessuale.

Le gonadi rudimentali subiscono poi un periodo di lento sviluppo somatico con nessuna differenziazione istologica o attività germinale, che può, a seconda delle specie, durare giorni, mesi o addirittura anni.

Nella maggior parte dei casi, specie che possiedono cromosomi sessuali citogeneticamente distinguibili non hanno influenze autosomiali o ambientali nella determinazione del sesso.

Sono state formulate due ipotesi riguardo ai possibili meccanismi, mediante i quali si realizza la determinazione del sesso:

1.Le PGC interpretano i fattori genetici o ambientali, trasformandosi poi direttamente in spermatogoni o oogoni, ed inducendo le cellule somatiche a differenziarsi in accordo, in modo da fornire un appropriato ambiente ormonale che supporti l'ulteriore differenziamento gonadale.

2. Le cellule somatiche, per prime interpretano i vari segnali (genetici ed ambientali) che determinano il sesso, e sono quindi esse ad indurre le PGC ad iniziare il differenziamento.

Differenziazione gonadale - specie gonocoriche

SPECIE GONOCORICHE = gli individui differenziano solo o come maschi o come femmine e rimangono dello stesso sesso per tutto l'arco della loro vita.

Nei teleostei gonocorici esaminati fino ad oggi, la differenziazione sessuale, inizia prima nelle gonadi delle femmine che in quelle dei maschi, solo poche specie mostrano una simultanea differenziazione di entrambi i sessi ed in nessuna specie si verifica la differenziazione sessuale prima nei maschi.

SPECIE GONOCORICHE DIFFERENZIATE

Da gonadi indifferenziate direttamente ad ovario o testicolo

Spigola

Sogliola

SPECIE GONOCORICHE INDIFFERENZIATE

Tutti gli individui sviluppano inizialmente un tessuto ovarico, e poi un fenotipo testicolare.

Ricciola

Aringa

SPECIE GONOCORICHE SECONDARIE

Tutti gli individui sviluppano inizialmente un tessuto ovarico, seguito da una fase intersessuale e poi un fenotipo testicolare.

Rombo

Differenziazione gonadale - specie ermafrodite

SPECIE ERMAFRODITE. Gli ermafroditi possono produrre nella loro vita nello stesso tempo gameti femminili e maschili

ERMAFRODITI SINCRONI
(ermafroditi simultanei)
Producono sia gameti femminili sia maschili

Rivulus marmoratus

ERMAFRODITI SEQUENZIALI

PROTERANDRI
Maturano prima come maschi

PROTEROGINI
Maturano prima come femmine

MONANDRE
I maschi derivano solo da pesci che erano maturati come FEMMINE

DIANDRE
I maschi derivano o da stadi bisessuali immaturi o per inversione sessuale delle femmine

Controllo endocrino della determinazione sessuale e della differenziazione gonadale

Tutti gli eventi associati alla determinazione del sesso ed alla differenziazione sessuale necessitano della comunicazione tra i differenti tipi cellulari. Questa è di tipo paracrino, durante la migrazione delle cellule germinali primordiali alle creste germinali e di tipo sia paracrino che endocrino, durante la successiva crescita e differenziazione delle gonadi.

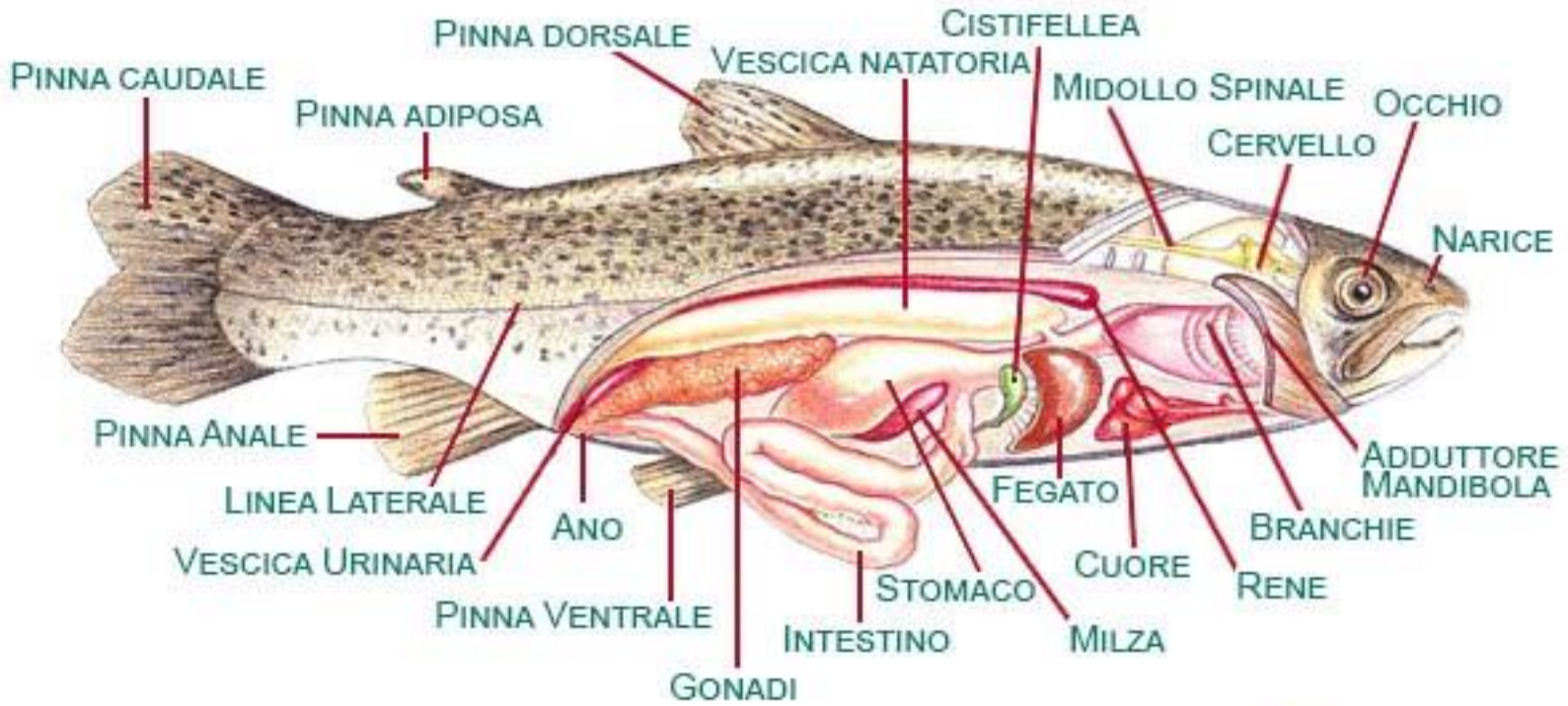
Evidenze sperimentali affidano agli steroidi sessuali prodotti nella gonade il controllo della differenziazione sessuale:

- ✓ l'estradiolo-17-β è responsabile dell'induzione e del mantenimento dello sviluppo ovarico;
- ✓ il testosterone e 11-chetotestosterone sono gli androgeni responsabili dello sviluppo testicolare.

Riguardo l'ontogenesi della produzione di steroidi nei pesci teleostei esiste, tuttavia, una diatriba irrisolta, poiché con le conoscenze attuali è difficile stabilire se il controllo della biosintesi degli steroidi si verifichi prima o dopo il processo di determinazione sessuale.

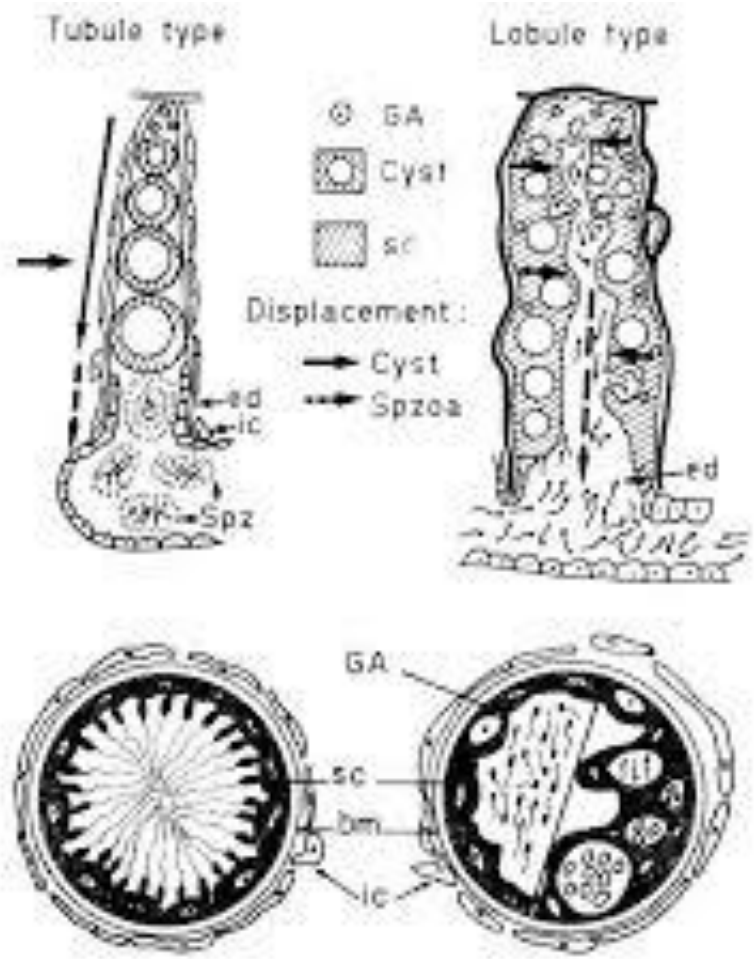
MORFOLOGIA DEL SISTEMA RIPRODUTTIVO DEI PESCI TELEOSTEI

Nei Teleostei adulti, a parte alcune eccezioni, le gonadi sono strutture pari, allungate, attaccate alla cavità corporea da entrambi i lati del mesentere dorsale. In molti Teleostei le pareti delle gonadi si estendono posteriormente a formare i gonodotti (ovidotti e spermiodotti) che spesso si fondono posteriormente prima di raggiungere il polo genitale.



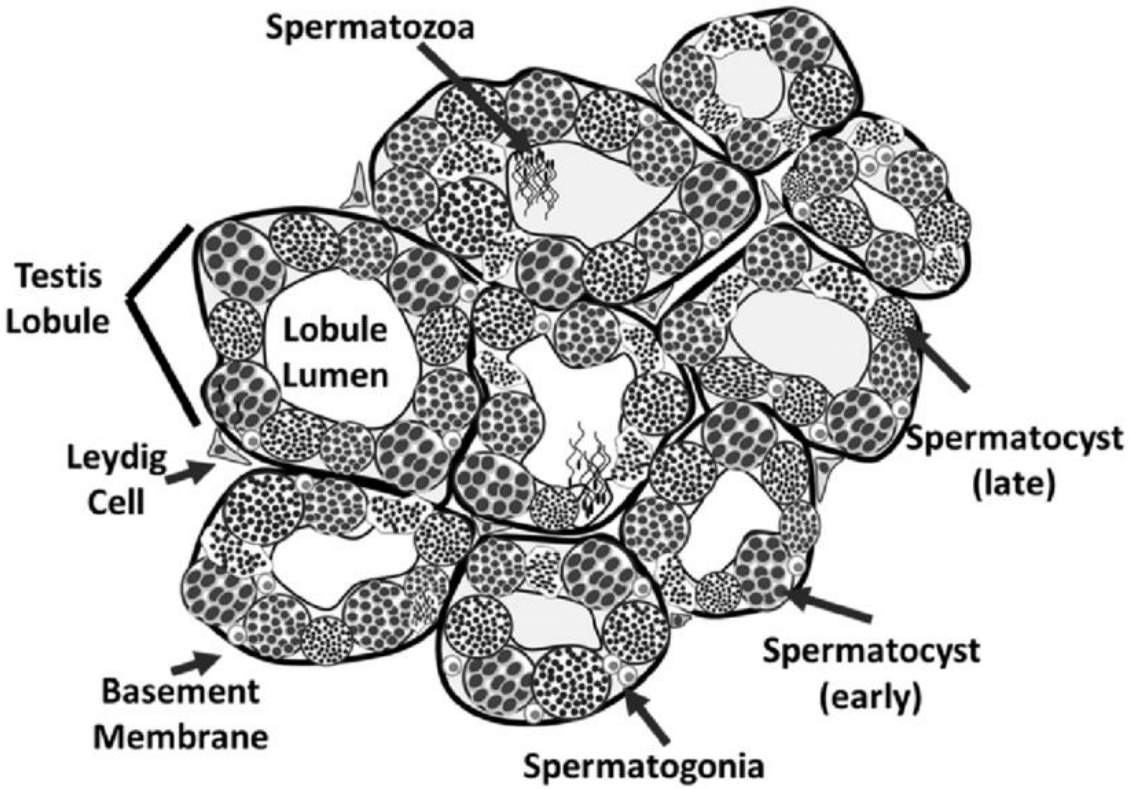
GuidaAllaPesca.IT

TESTICOLI



I testicoli, in molti teleostei, sono organi appaiati e presentano una forma generalmente allungata, sono separati, ma in alcune specie (Perca e Cyprinus) nella parte caudale si fondono ed assumono forma di Y.

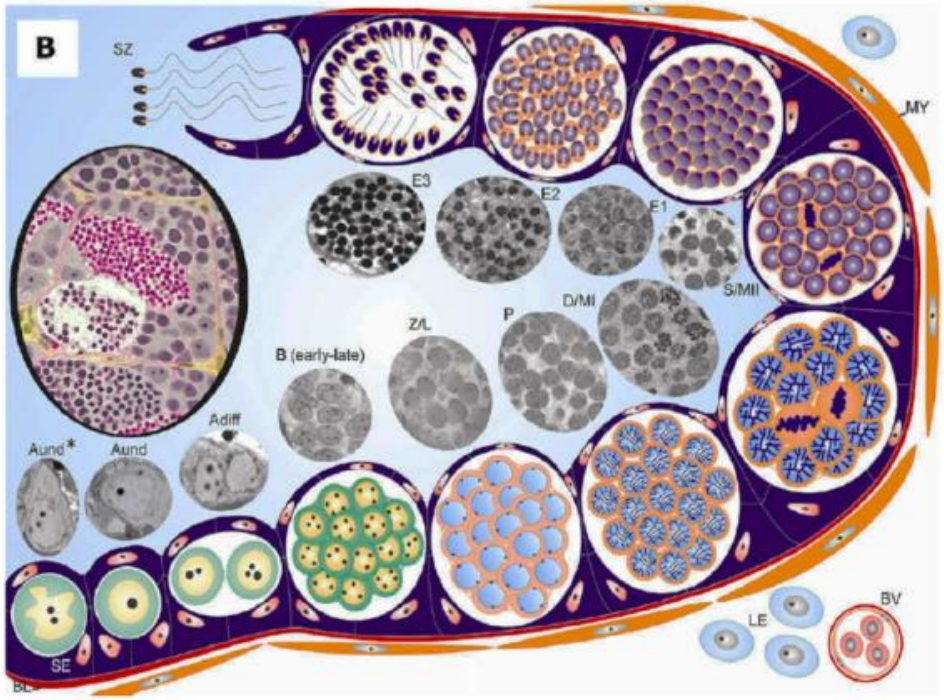
Istologicamente si possono distinguere due tipologie di testicoli: **lobulari** e **tubulari.** I **testicoli lobulari** sono composti da numerosi lobuli (separati tra loro da un sottile strato di tessuto connettivo fibroso) all'interno dei quali le spermatocisti si sviluppano lungo il fondo cieco del lobulo e migrano verso il sistema efferente. Nei **testicoli tubulari** i compartimenti germinali sono tubuli cavi che formano anastomosi tra loro per tutta la lunghezza. Le spermatocisti sono situate lungo la membrana basale del tubulo per tutta la sua lunghezza e non migrano.



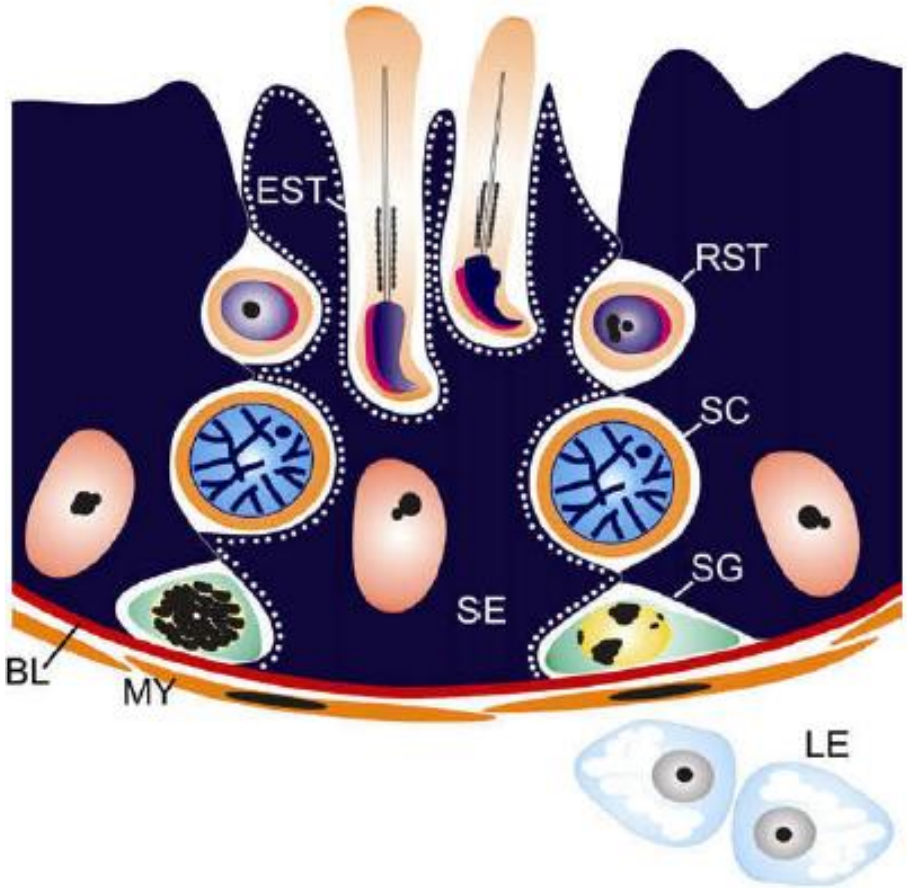
Nei testicoli dei teleostei sono distinguibili due compartimenti uno interstiziale tra i lobuli (o tubuli) ed uno lobulare (o tubulare) separati da una barriera emotesticolare. Nello spazio interstiziale sono presenti vasi sanguigni, linfatici, fibroblasti e le cellule di Leydig. Le cellule del Leydig sono grandi cellule poligonali la cui funzione principale è di produrre gli steroidi.

Lo spazio lobulare (o tubulare) è delimitato dalla membrana basale e da cellule mioidi e contiene l'epitelio germinativo costituito da: cellule somatiche (Sertoli) e le cellule germinali a differenti stadi di sviluppo.

Nei pesci l'unità spermatogenetica dei testicoli è la **spermatocisti**, che corrisponde ad un clone di cellule germinali isogenetiche racchiuse da una o più cellule del Sertoli che formano la parete delle cisti.



In fishes we find the cystic type of spermatogenesis. There are two main differences compared to the testis of higher vertebrates. First, within the spermatogenic tubules, cytoplasmic extensions of Sertoli cells form cysts that envelope a single, clonally and hence synchronously developing group of germ cells deriving from a single spermatogonium. Second, the cyst-forming Sertoli cells retain their capacity to proliferate also in adult fish. Hence, the basic functional unit of the spermatogenic epithelium in fish is a spermatogenic cyst formed by a dynamic group of Sertoli cells surrounding and nursing one synchronously developing germ cell clone. Different clones being in different stages of development generate the typical histological picture of fish testes, where the tubular compartment contains differently sized groups of germ cells in different stages of spermatogenesis

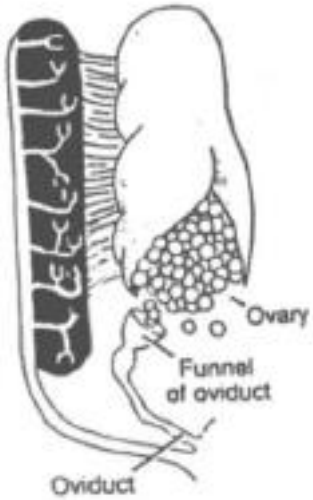


In amniote vertebrates (reptiles, birds, mammals) it is considered that Sertoli cells proliferate until puberty when only spermatogonia and a few early spermatocytes are present in the germinal epithelium. Hence, the adult amniote testis contains a fixed number of ‘‘immortal” Sertoli cells supporting successive waves of spermatogenesis.

During these waves, a given Sertoli cell supports at the same time different developmental stages of germ cells (i.e. cells belonging to different clones). For example, the Sertoli cell basis contacts spermatogonia, whereas lateral parts contact spermatocytes and early spermatids, and adluminal parts late spermatids

OVARI

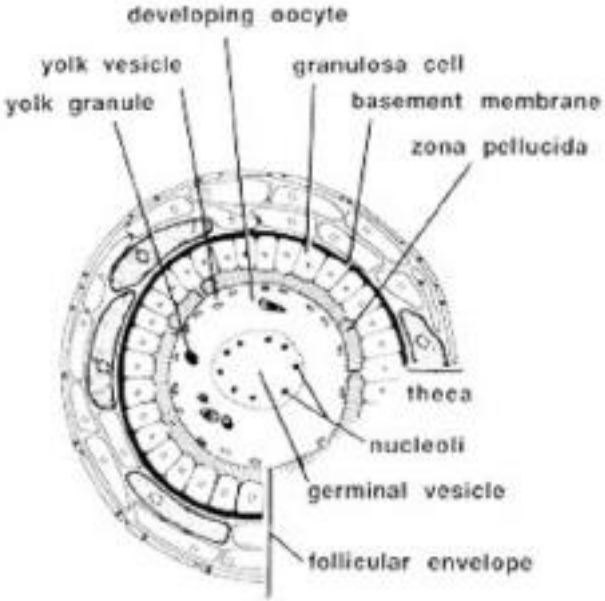
Gli ovari come i testicoli, originano come strutture pari su entrambi i lati del mesentere. Presentano una forma allungata longitudinalmente, e possono essere fuse completamente o solo parzialmente nella parte caudale.
Dal punto di vista strutturale gli ovari dei teleostei si distinguono in: GIMNO-OVARI e CISTO-OVARI. I GIMNO-OVARI sono presenti in tutti i teleostei, eccetto i salmonidi, sono caratterizati dal fatto che manca una cavità ovarica e le uova sono rilasciate nella cavità celomatica e convogliate nell'ovidutto mediante l'epitelio ciliato. Nelle specie con CISTO-OVARI le uova passano direttamente dalla superficie dell'ovario nell'ovidotto.



GIMNO-OVARIO

CISTO-OVARIO

Nell'ovario dei teleostei, come in tutti i vertebrati sono presenti due zone: una porzione centrale più profonda, la **zona medullare**, ed un ampio strato esterno, la **zona corticale**. La prima è composta da una struttura di tessuto connettivo lasso contenente un gran numero di piccoli vasi sanguigni, linfatici e nervi; mentre la seconda contiene un gran numero di follicoli nei differenti stadi di sviluppo, microscopici nei giovani e grandi negli adulti.
I follicoli sono costituiti da uno strato esterno, le cellule della teca, ed uno interno le cellule della granulosa separati dalla lamina basale. I **follicoli** sono la principale unità funzionale dell'ovario perchè supportano lo sviluppo dell'oocita in particolare grazie alla loro attività steroidogenica. Istologicamente le dimensioni dei follicoli variano in base all'età dell'animale.



In base alla modalità di sviluppo dell'ovaio sono stati individuati differenti tipi di ovari:

✓ L'ovario a sviluppo sincrono contiene tutti gli oociti allo stesso stadio di sviluppo ed è tipico delle specie semelpare che rilasciano i gameti una sola volta nel corso della loro vita e poi muoiono, come il salmone del Pacifico.

✓ L'ovario a gruppo sincrono contiene sia gruppi di oociti vitellogenici, sia popolazioni di oociti che subiscono maturazione e poi ovulazione. Questo tipo d'ovario è tipico delle specie iteropare, che rilasciano i gameti una sola volta all'anno, durante la loro breve stagione riproduttiva (es. trota arcobaleno *Oncorhynchus mykiss*).

✓ L'ovario a multipli gruppi sincroni contiene più popolazioni di oociti a differenti stadi di sviluppo, ed è caratteristico di quelle specie, che depongono i gameti diverse volte durante la stessa stagione, quest'ultima modalità di sviluppo è la più comune nei pesci teleostei

✓ Sviluppo continuo di oociti con rilascio dei gameti durante tutto l'anno (pesci tropicali).

Alcune specie presentano un dimorfismo sessuale (caratteristiche e a volte dimensioni diverse a seconda del sesso). Per altre ancora bisogna ricorrere all'analisi delle **gonadi** per riconoscerne il **sesso**. Sono appunto due caratteristiche il colore e la forma delle gonadi ad indicarci il sesso della specie che stiamo osservando.

Riconoscere il sesso dei pesci

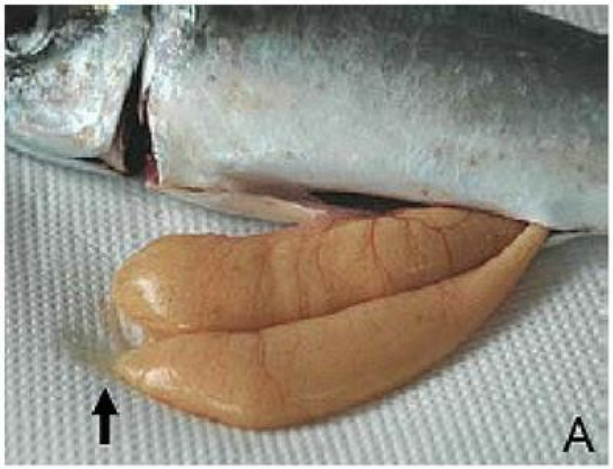


Figura A: femmina matura di Scomber japonicas

Figura B: testicoli di Scomber japonicas

GAMETOGENESI

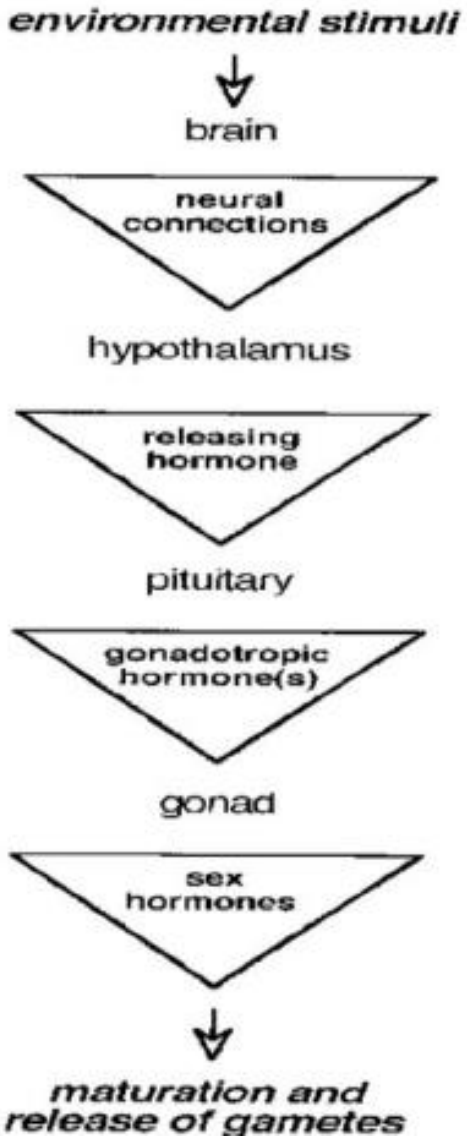
L'ASSE RIPRODUTTIVO

L'asse ipotalamo-pituitaria-gonade è costituito da tre distretti fisiologicamente connessi.

I neuroni neuroendocrini localizzati nella regione preottica del cervello formano un'interfaccia tra il sistema nervoso centrale ed il sistema endocrino. Gli input stimolatori ed inibitori vengono recepiti da questi neuroni e la loro integrazione viene tradotta nel rilascio o meno del GnRH.

Nei teleostei, tali neuroni innervano direttamente le cellule (gonadotropi) che producono le gonadotropine (GtHs) localizzate nella pituitaria, stimolandole a produrre e rilasciare le due distinte, ma chimicamente simili gonadotropine l'ormone follicolo stimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH), che nei pesci vengono chiamate rispettivamente GtHI e GtHII.

Le gonadi hanno due funzioni principali, la produzione delle cellule germinali durante la spermatogenesi e oogenesi e la produzione degli ormoni steroidei (steroidogenesi) e dei fattori di crescita, necessari per la regolazione della riproduzione, sia per azione diretta, paracrina ed autocrina, sui tessuti gonadali, sia indiretta sull'ipotalamo ed ipofisi.



GnRH

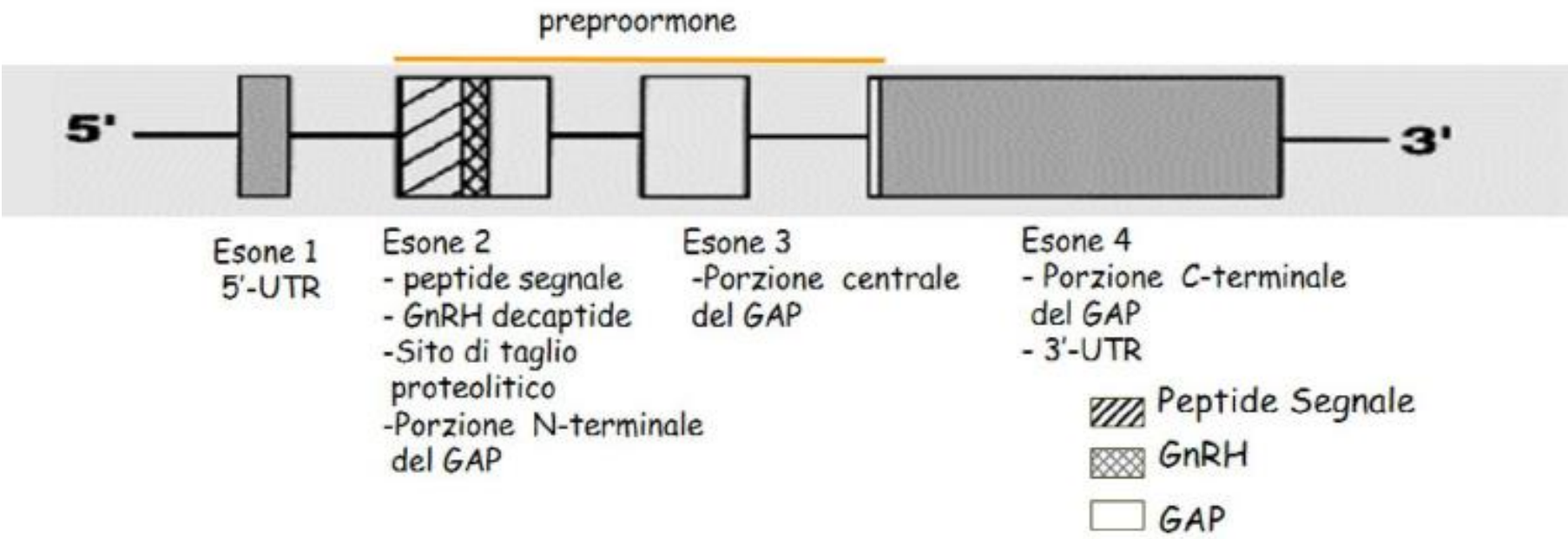
- **Il principale ormone prodotto dal cervello dei pesci teleostei è L'ORMONE RILASCIANTE LE GONADOTROPINE (GnRH).**
- **È un decapeptide fortemente conservato dal punto di vista filogenetico. A tutt'oggi sono state identificate nel tessuto nervoso dei vertebrati 14 isoforme che prendono il nome, ad eccezione di quella dei mammiferi, dalla specie dalla quale sono state isolate. Dal cervello dei pesci sono state isolate 8 isoforme (GnRHs).**

Amino acid sequence of the 14 GnRH variants identified in vertebrates

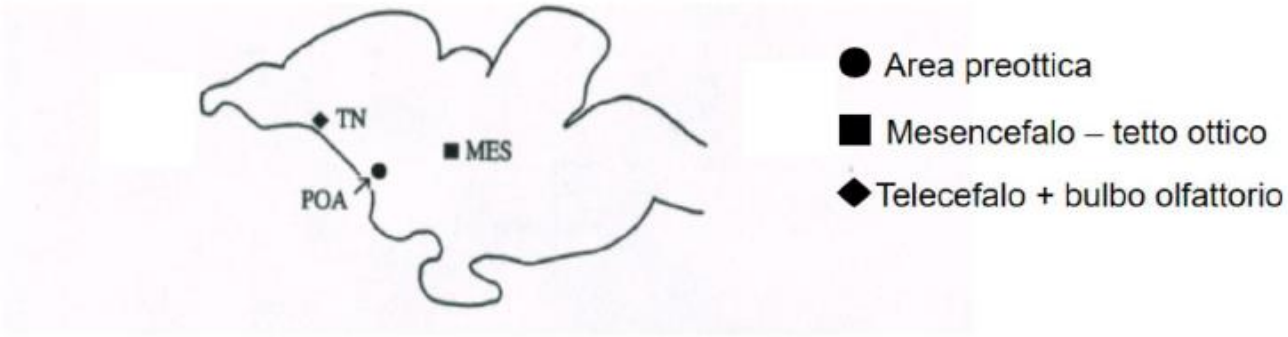
Teleosts											
Mammalian GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH_2	Matsuo et al. (1971)
Chicken GnRH-II	—	—	—	—	His	—	Trp	Tyr	—	—	Yu et al. (1988)
Pejerey GnRH	—	—	—	—	Phe	—	—	Ser	—	—	Montaner et al. (2001)
Seabream	—	—	—	—	—	—	—	Ser	—	—	Powell et al. (1994)
Salmon GnRH	—	—	—	—	—	—	Trp	Leu	—	—	Sherwood et al. (1983)
Catfish GnRH	—	—	—	—	His	—	—	Asn	—	—	Bogerd et al. (1992)
Herring GnRH	—	—	—	—	His	—	—	Ser	—	—	Carolsfeld et al. (2000)
Whitefish GnRH	—	—	—	—	—	—	Met	Asn	—	—	Adams et al. (2002)
Other vertebrates											
Mammalian GnRH	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly-NH_2	King et al. (1990)
Frog GnRH	—	—	—	—	—	—	—	Trp	—	—	Yoo et al. (2000)
Lamprey GnRH-I	—	—	Tyr	—	Leu	Glu	Trp	Lys	—	—	Sower et al. (1993)
Lamprey GnRH-III	—	—	—	—	His	Asp	Trp	Lys	—	—	Sower et al. (1993)
Dogfish GnRH	—	—	—	—	His	—	Trp	Leu	—	—	Lovejoy et al. (1992)
Guinea pig GnRH	—	Tyr	—	—	—	—	Val	—	—	—	Jimenez-Linan et al. (1997)
Chicken GnRH-I	—	—	—	—	—	—	—	Gln	—	—	Miyamoto et al. (1982)

Eight of these variants are found in teleost fish.

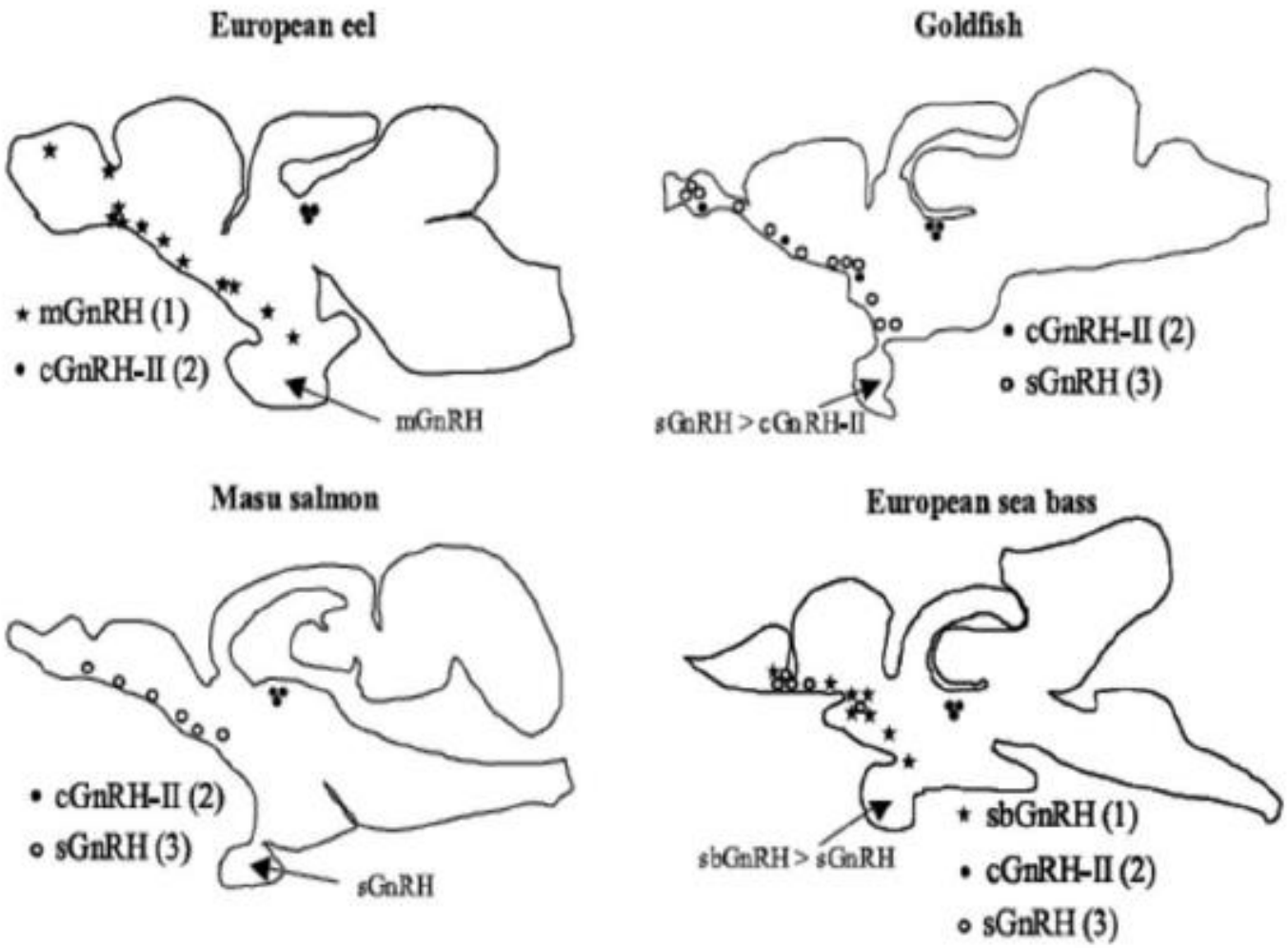
- I distinti geni che codificano per ciascuna delle isoforme sono costituiti tutti da tre introni e quattro esoni. Il secondo, terzo e parte del quarto esone codificano per il preproormone del GnRH, il quale risulta costituito da un peptide segnale (21-23 amminoacidi), dal GnRH (10 aminoacidi), da un sito di taglio proteolitico (Gly-Lys-Arg), e da un peptide associato al GnRH (GAP, 40-60 aminoacidi).
- Il secondo esone mostra la sequenza maggiormente conservata, mentre gli altri esoni mostrano una elevata variabilità, da ciò risulta che il peptide segnale e le GnRHs sono molto più conservate, rispetto alle GAP.



In addition to the preoptic/hypothalamic GnRH, other molecular forms of GnRH have been found to be expressed in the extrapreoptic/hypothalamic area within the central nervous system of all vertebrates tested to date



Nella maggior parte dei teleostei sono presenti tre differenti forme di GnRHs espresse in differenti regioni del cervello, in distinti gruppi cellulari (APO-GnRH, NT-GnRH e CM-GnRH).



In tutti i teleostei è presente l'isoforma cGnRH (chicken) localizzata nel **tetto ottico**, mentre in buona parte di essi è presente la sGnRH (salmon) a livello dei nervi terminali e nel bulbo olfattorio. Il terzo tipo di isoforma varia a seconda della specie. In molti teleostei è presente la **sbGnRH**, la quale risulta spesso espressa nell'area preottica al confine con l'ipotalamo da dove si proiettano le fibre contenenti i neuroni secernenti GnRH verso la pituitaria.

Distribution of GnRH variants in the brain of teleost fish

	Tel	POA	MT	Reference
Anguilliformes				
Eel *Anguilla anguilla*	m	m	cII	Montero et al. (1994)
Pantodonidae				
Butterfly fish *Pantodon buchholzi*	m?	m?	cII?	O'neill et al. (1998)
Osteoglossiformes				
Arowana *Scleropages jardini*	s?	s?	cII?	Okubo et al. (2001)
Clupeiformes				
Herring *Clupea harangus*	s?	hg?	cII?	Carolsfeld et al. (2000)
Cypriniformes				
Goldfish *Carassius auratus*	s	s	cII	Yu et al. (1988)
Zebrafish *Danio rerio*	s	s	cII	Powell et al. (1996)
Siluriformes				
African catfish *Clarias gariepinus*	cf	cf	cII	Zandbergen et al. (1995)
Characiformes				
Pacu *Piaractus mesopotamicus*	s	sb	cII	Powell et al. (1997)
Salmoniformes				
Whitefish *Coregonus clupeaformis*	s?	wf?	cII?	Adams et al. (2000)
Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*	s	s	cII	Okuzawa et al. (1990)
Masu salmon *Oncorhynchus masou*	s	s	cII	Amano et al. (1991)
Atheriniformes				
Pejerey *Odontheates bonariensis*	s	pj	cII	Montaner et al. (2001)
Synbranchiformes				
Swamp eel *Synbranchus marmoratus*	s?	pj?	cII?	Somoza et al. (2002)
Beloniformes				
Medaka *Oryzias latipes*	s	pj	cII	Okubo et al. (2000a,b)
Cyprinodontiformes				
Latyfish *Xiphophorus maculatus*	s?	pj?	cII?	Somoza et al. (2002)
Scorpaeniformes				
Grass rockfish *Sebastes rastrelliger*	s?	sb?	cII	Powell et al. (1996)
Perciformes				
African cichlid Haplochromis burtoni	s	sb	cII	White et al. (1995)
Seabream *Sparus aurata*	s	sb	cII	Gothilf et al. (1996)
Striped bass *Morone saxatilis*	s	sb	cII	Chow et al. (1998)
Sea bass *Dicentrarchus labrax*	s	sb	cII	Gonzalez-Martinez et al. (2001)
Red seabream *Pagrus major*	s	sb	cII	Senthilkumaran et al. (1999)
Tilapia *Oreochromis mossambicus*				
Pleuronectiformes				
Barfin flounder *Verasper moseri*	s	sb	cII	Amano et al. (2002)
Turbot *Scophthalmus maximus*	s	sb	cII	Andersson et al. (2001)
Tetraodontiformes				
Torafugu *Fugu rubripes*	s?	sb?	cII?	Aparicio et al. (2002); this study

For clarity purpose, three main populations (olfactory bulbs + telencephalon: Tel, preoptic area: POA and midbrain tegmentum: MT) have been considered. Question marks refer to studies in which the distribution has not been formally established from neuroanatomical studies, but can be

- Sebbene il ruolo fisiologico di ciascuna isoforma del GnRH non è del tutto conosciuto, l'espressione delle differenti isoforme in differenti gruppi di corpi cellulari localizzati in regioni del cervello diverse, suggerisce nei teleostei la possibile esistenza di tre distinti sistemi neuronali secernenti GnRH con ruoli fisiologici distinti. Sulla base delle distribuzioni nel cervello, della concentrazione nella pituitaria e del livello di espressione durante il ciclo riproduttivo, l'isoforma di GnRH espressa **nell'area preottica è la principale responsabile del rilascio delle gonadotropine dalla pituitaria**.

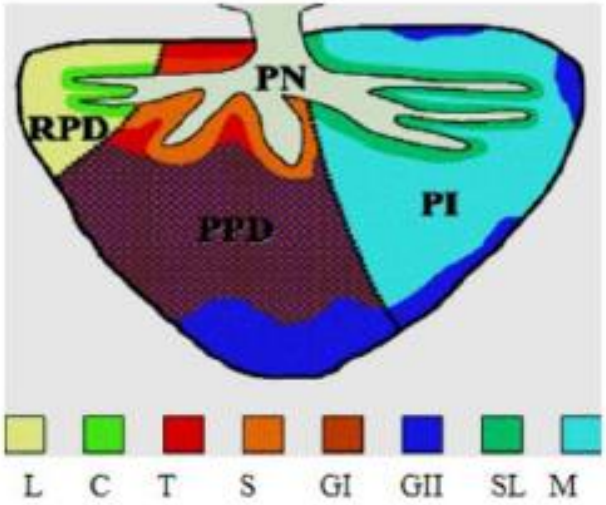
- Il ruolo degli altri due sistemi è incerto, ma la funzione più accreditata è quella della neuromodulazione ed un loro coinvolgimento nella relazione che intercorre tra l'informazione olfattiva, la riproduzione ed il comportamento riproduttivo. In particolare, le isoforme prodotte nell'area del **bulbo olfattivo** sono coinvolte nella **trasmissione dei segnali feromonali sessuali**, mentre il GnRH prodotto dai **neuroni del mesencefalo** potrebbe essere implicato nel **controllo cronobiologico della riproduzione**.

IPOFISI: morfologia

- La ghiandola pituitaria nei teleostei, come negli altri vertebrati, è composta da due parti:

la neuroipofisi e l'adenoipofisi.

- Nei teleostei l'adenoipofisi è suddivisa in una parte distale (PD) e una parte intermedia (PI).
- La PD è ulteriormente divisa in una parte distale rostrale (RPD) e una parte distale prossimale (PPD).
- A differenza dei mammiferi, nei teleostei manca un sistema portale ipotalamo-ipofisi per il trasporto dei regolatori neuroormonali, per cui esiste un trasporto assonale diretto, dai neuroni ipotalamici ai gonadotropi attraverso la neuroipofisi (*pars nervosa*, PN). La pituitaria dei teleostei presenta una organizzazione a compartimenti, nella quale ogni specifica cellula che produce ormoni è localizzata in uno specifico compartimento.



- cellule lattotrope (L),
- cellule corticotrope (C),
- cellule tireotrope (T),
- cellule somatotrope (S),
- cellule gonadotrope producenti la GTHI (GI),
- cellule gonadotrope producenti la GtHII (GII),
- cellule producenti la somatolattina (SL)
- e cellule melanotrope (M)

GnRH

GnRH receptor

αq

β γ

PLC

DAG

PKC

?

Ca^{2+} channel

IP3

MAPK

Ca^{2+} channel

Ca^{2+}

?

CaM

GTH gene expression

?

GTH secretion

GnRH-RE GTH genes

GTH subunits

A tGnRH-R-I

Glycosylation

Extracellular

PKA

PKC

Intracellular

PKC

B tGnRH-R-II

Glycosylation

Extracellular

PKA

PKC

Intracellular

PKC

Gonadotropine

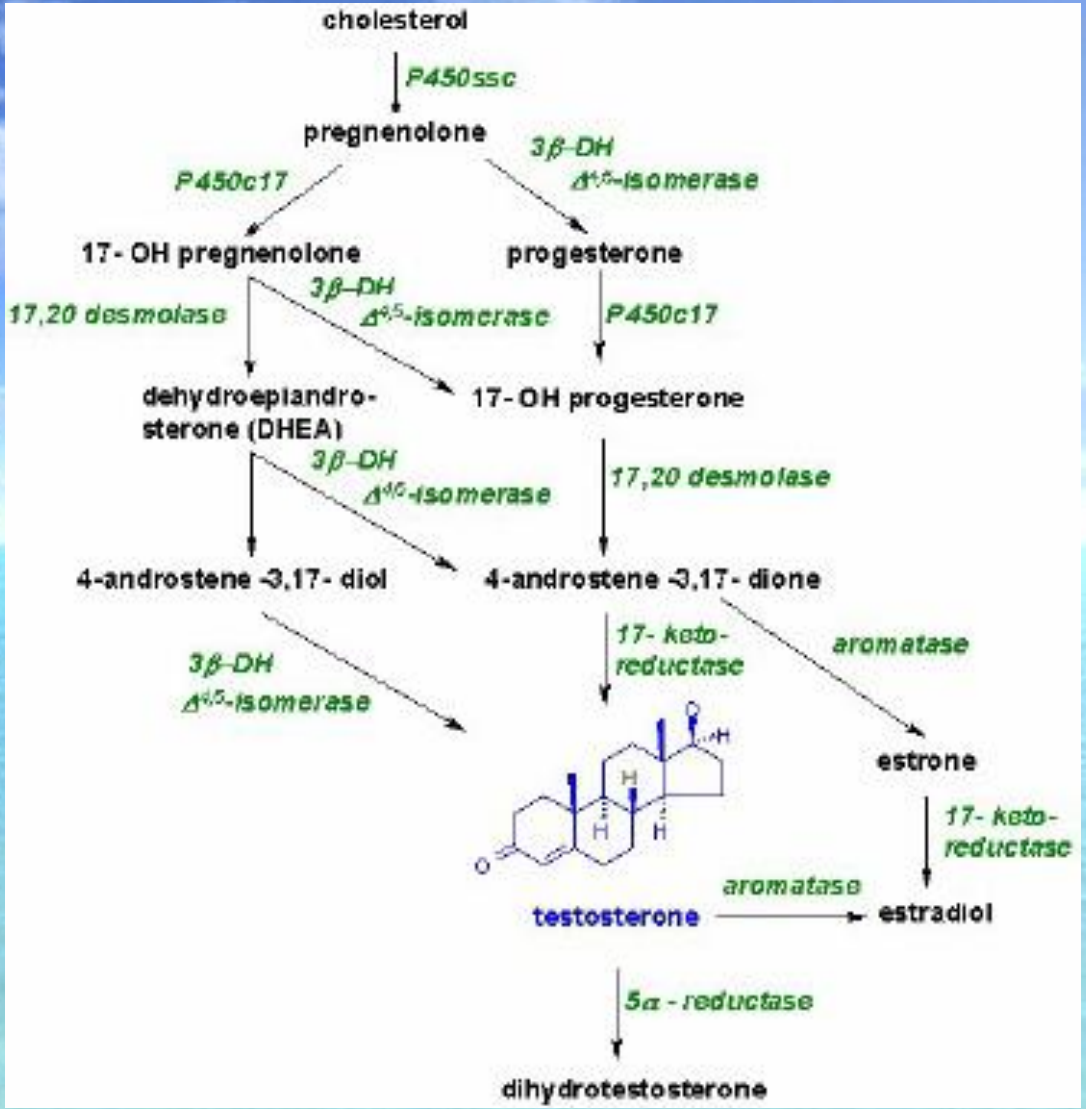
- Tra gli ormoni sintetizzati e secreti dalla pituitaria sicuramente le GtHs, svolgono il ruolo più importante nella riproduzione in quanto stimolano la maturazione e lo sviluppo delle gonadi nei vertebrati.
- Tali effetti apparentemente non sono diretti ma piuttosto esercitati attraverso la biosintesi gonadale degli ormoni steroidei e dei fattori di crescita.
- Nei teleostei vengono prodotte 2 gonadotropine: la GtHI (FSH simile), e la GtHII (LH simile).
- Le GtHs sono ormoni glicoproteici. Sono degli eterodimeri costitutiti da una subunità α comune ed una subunità β specifica (βFSH e βLH), ognuna delle quali è codificata da un singolo gene. Le subunità sono delle catene peptidiche (circa 100 amminoacidi), con una struttura resa complessa dalla presenza di catene oligosaccaridiche O- ed N- glicosilate, e dalla formazione di ponti disolfuro tra i residui di cisteina che risultano localizzati in posizioni altamente conservate nella sequenza delle subunità.
- L'associazione non covalente delle due subunità (alfa e beta) determina il rilascio dell'ormone dimerico attivo

Le GtHs esercitano la loro attività attraverso l'interazione con recettori specifici localizzati nelle gonadi. Nei pesci, così come nei mammiferi, sono stati identificati due tipi di recettori per le GtHs. Il recettore di tipo I (RI) interagisce sia con la GtHI sia con la GtHII, mentre il recettore di tipo II (RII) interagisce esclusivamente con la GtHII. Tali recettori appartengono alla famiglia dei recettori di membrana accoppiati alle proteine G, contenenti sette domini transmembrana. Nell'ovario vitellogenico i recettori delle GtHs sono stati trovati sia sulle cellule della granulosa sia su quelle della teca, mentre nel follicolo preovulatorio solo nella teca. Nei maschi entrambi i recettori sono stati trovati durante tutta la spermatogenesi, mentre durante la spermiazione è stato trovato nelle cellule del Leydig solo il RII.

Gonadi: endocrinologia

Le gonadi dei pesci teleostei producono sia ormoni steroidei sia peptidici.

La biosintesi degli ormoni steroidei nei pesci è regolata da una complessa serie di enzimi, ed i geni che ne regolano l'attività sono espressi in maniera differenziata nelle cellule somatiche del testicolo e dell'ovario. Il processo di sintesi inizia con la conversione del colesterolo in pregnenolone, seguita dalla produzione di progesterone.



bamboo design

Gonadi: endocrinologia

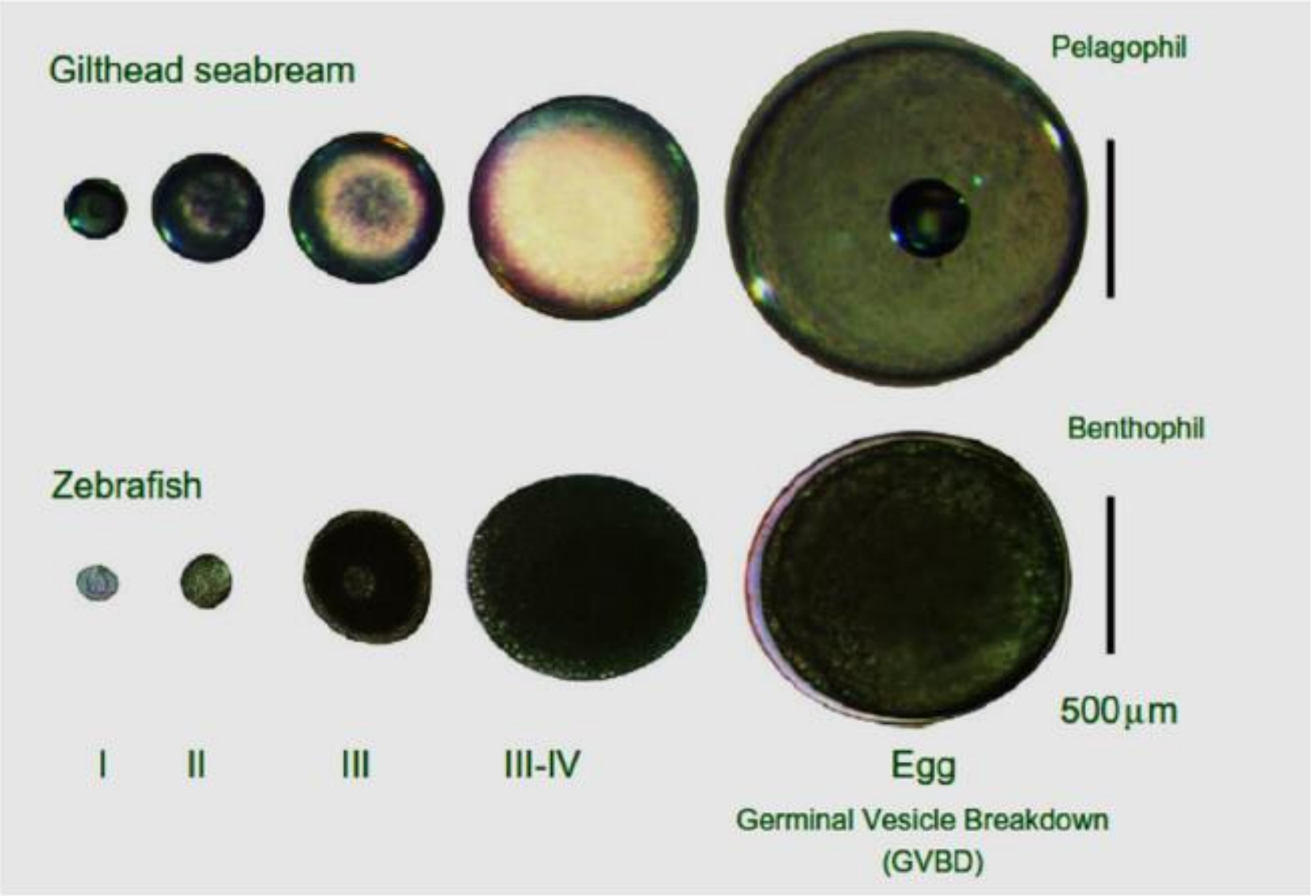
Importanti ormoni proteici prodotti dalle gonadi sono l'**attivina** e l'**inibina**.

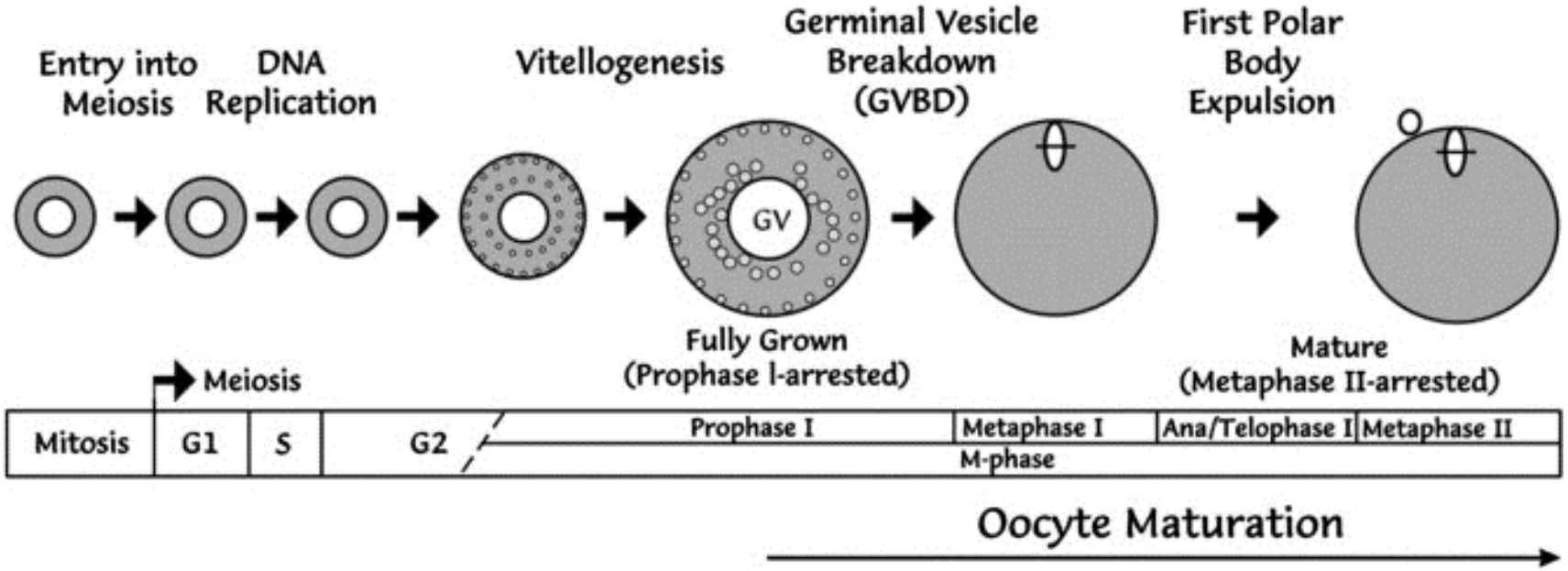
Entrambe sono proteine dimeriche appartenenti alla superfamiglia dei Transforming Growth Factor–b (TGF-b). L'attivina è un omo- o eterodimero di due differenti peptidi, ßA e ßB, legati tra loro da ponti disolfurei (ßAßA, ßAßB e ßBßB da cui attivina A, attivina AB ed attivina B).

L'inibina è un eterodimero di una subunità ß dell'attivina ed una distinta subunità a (inibina A, aßA ed inibina B aßB).

Entrambe le proteine in particolare l'attivina sono ampiamente diffuse e funzionano in molti tessuti (gonadi, pituitaria e cervello) come fattori paracrini ed autocrini regolando in tal modo molti processi fisiologici incluso la riproduzione.
Nel sistema riproduttivo l'attivina e l'inibina regolano il rilascio del GnRH dall'ipotalamo, le gonadotropine dalla pituitaria, la steroidogenesi e la gametogenesi.

Oogenesi e sua regolazione endocrina


Gilthead seabream
Pelagophil
Zebrafish
Benthophil
500 µm
I
II
III
III-IV
Egg
Germinal Vesicle Breakdown
(GVBD)



L'oogenesi è il processo attraverso il quale le PGCs divengono uova mature pronte per essere fertilizzate. Essa può essere suddivisa in 5 principali fasi:

(1) trasformazione delle PGCs in oogoni (differenziazione sessuale),
(2) trasformazione degli oogoni in oociti (inizio della meiosi),
(3) Vitellogenesi (sviluppo degli oociti mentre si è arrestata la prima divisione meiotica)
(4) Maturazione (ripresa della meiosi),
(5) Ovulazione (espulsione dell'uovo dal suo follicolo).

Sviluppo dell'oocita - Previtellogenesi

Alla pubertà ed all'inizio di ciascun ciclo riproduttivo, una frazione d'oogoni presente nell'ovario della maggior parte dei pesci teleostei subisce una serie di divisioni mitotiche seguite dalla loro entrata in meiosi.

Segue una fase di sviluppo dell'oocita distinta in previtellogenesi e vitellogenesi. Durante la previtellogenesi:

•il **diametro del follicolo ovarico aumenta** di più di un ordine di grandezza ed inizia un'intensa attività sintetica.

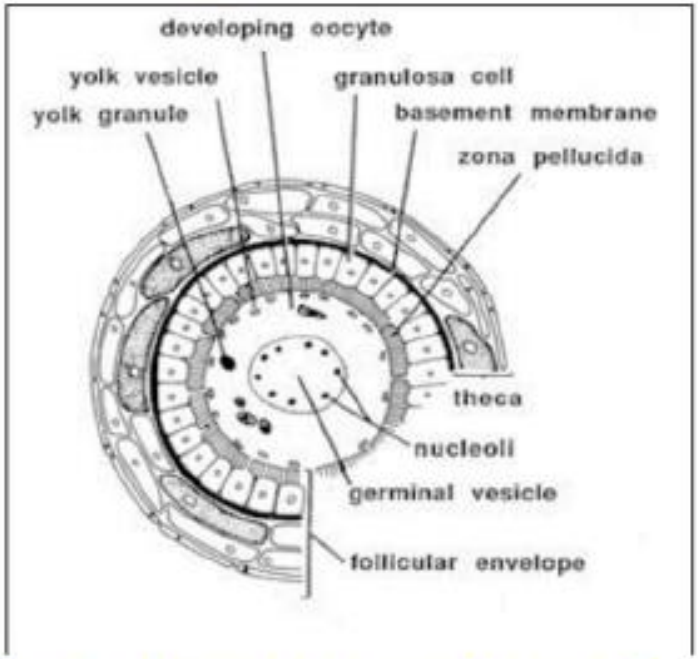
•sono **prodotte dai nucleoli (localizzati alla periferia della vescicola germinale) grandi quantità di RNA ribosomiale** e la maggior parte del mRNA presente nell'oocita maturo che codificano per le proteine necessarie per la successiva crescita dell'ovocita come i recettori per la vitellogenina ed enzimi per la trasformazione del tuorlo (catepsine).

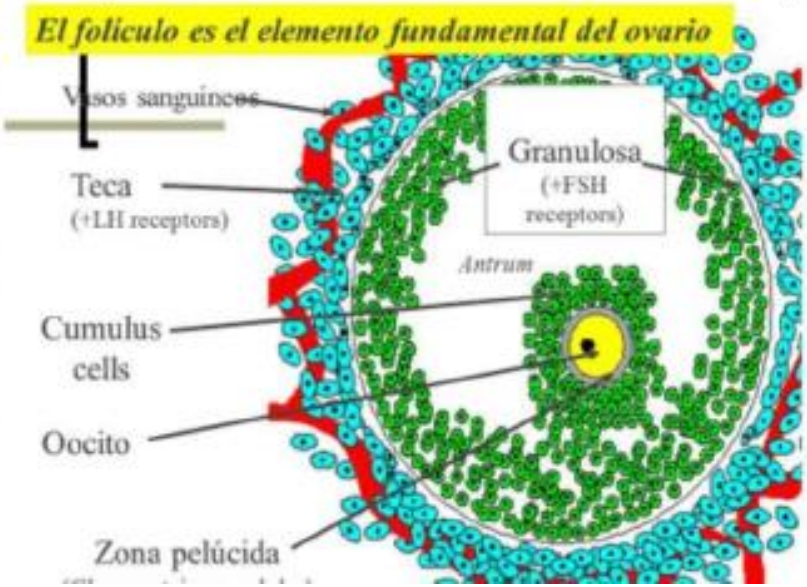
•sono **sintetizzate anche grandi quantità di glicoproteine**, che sono poi incorporate in alveoli neo formati alla periferia dell'oocita che con il procedere dello sviluppo previtellogenico aumentano in numero ed in taglia.

•inizia la **deposizione dei lipidi**

•avvengono **grandi cambiamenti strutturali nella parete del follicolo ovarico**: s'ispessisce la zona pellucida ed i microvilli si allungano mantenendo così il contatto con la granulosa tramite dei pori canale.

•La produzione della parete follicolare é sotto il controllo degli estrogeni ovarici, i quali sono a loro volta controllati dalla GtHI e dalla GtHII

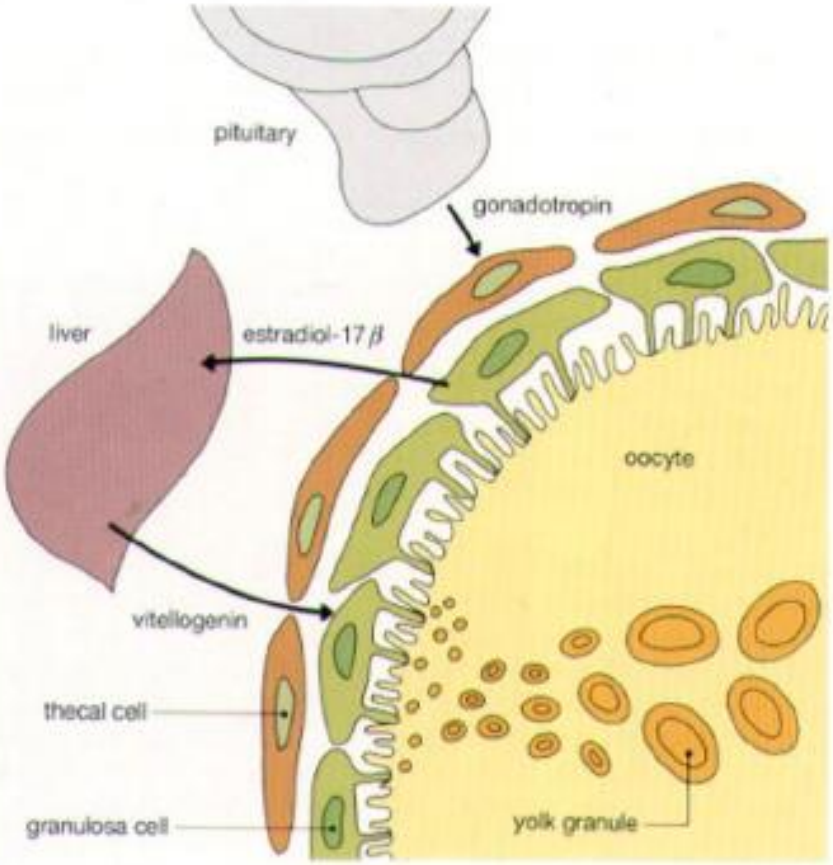


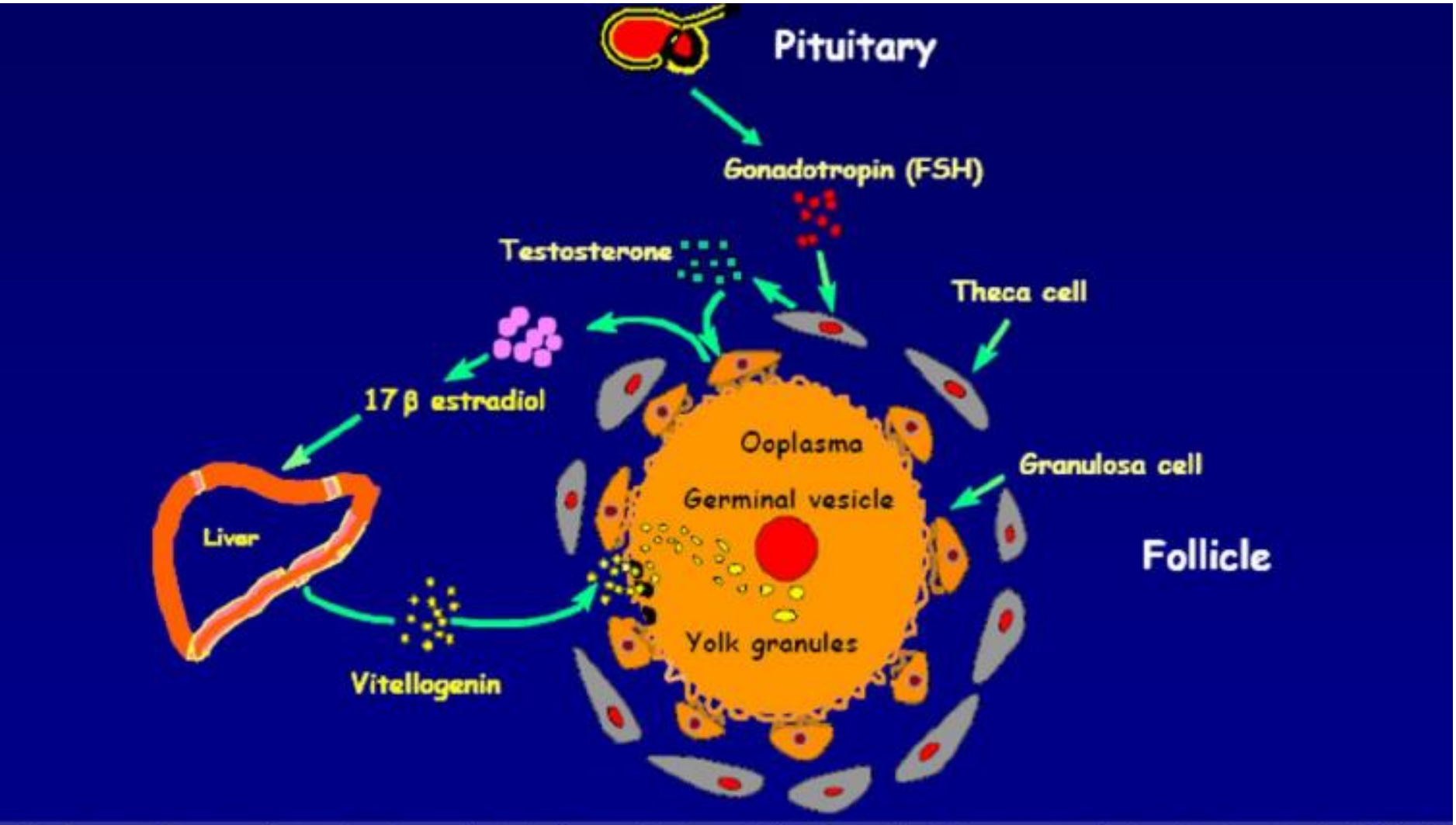


Vitellogenesi

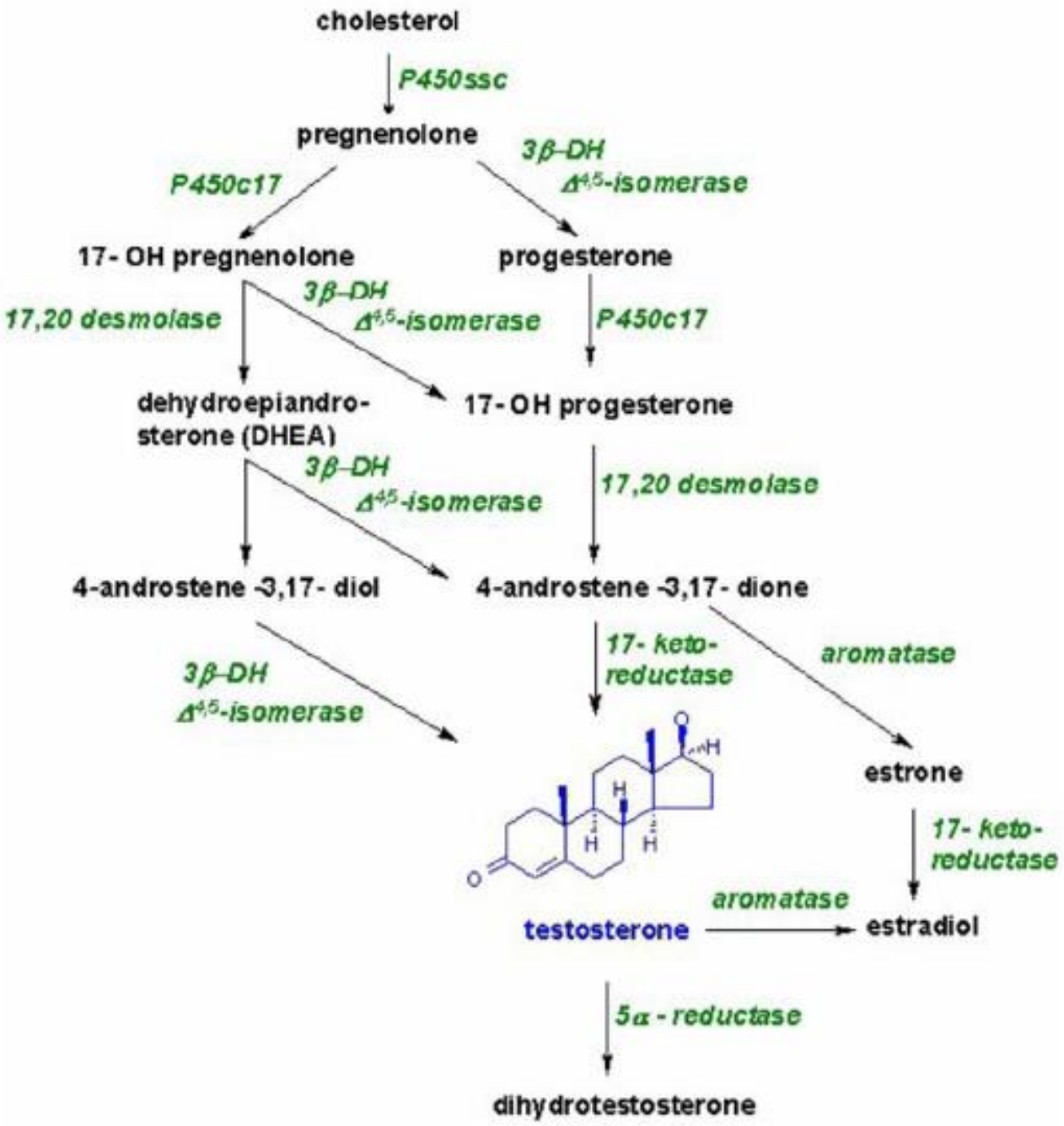
Lo sviluppo vitellogenico è caratterizzato dall'accumulo dentro l'oocita delle proteine del tuorlo in particolare della vitellogenina (Vg). La Vg, considerata il precursore delle proteine del tuorlo, è una grande (300-600kDa) glicofosfolipoproteina sintetizzata dal fegato e trasportata per via ematica nell'ovario durante lo sviluppo dell'oocita. La sintesi epatica della Vg avviene dopo attivazione dell'asse I-P-G come risposta a segnali ambientali ed endogeni.

La Vg entra nel follicolo ovarico attraverso i capillari sanguigni dello strato tecale, attraversa lo spazio intercellulare della teca e della granulosa e si lega a recettori specifici (VgR) localizzati sulla superfice dell'oocita. Il complesso Vg-VgR è endocitato in aree specializzate della membrana, e sospinto verso la periferia del citoplasma dando origine a delle vescicole che si fondono con i corpi multivescicolari lisosomi-simili in cui avviene la scissione proteolitica della Vg da parte delle catepsine (in lipovitellina e fosfivitina). Il prodotto maggiore della Vg è la Lv la quale è costituita da due polipeptidi (LvA e LvB) e rappresenta un'importante sorgente d'amminoacidi e lipidi che supporta lo sviluppo embrionale. La fosfvitina è largamente costituita da residui di serina a cui si lega covalentemente il P e ionicamente il Ca^{2+}. La Pv libera i minerali necessari all'embrione per lo sviluppo scheletrico e per le funzioni metaboliche. La Vg dei teleostei contiene circa il 20% di lipidi e di questi il 60-80% sono fosfolipidi polari (fosfatidilcolina o fosfatidiletanolammina). Quindi la Vg trasporta principalmente nell'oocita in sviluppo, lipidi strutturali ed acidi grassi essenziali, allo scopo di supportare lo sviluppo tissutale embrionale, invece i lipidi neutri sono assorbiti con altre modalità e sono stoccati come isolate inclusioni oleiche per rispondere alla domanda energetica durante l'embriogenesi.

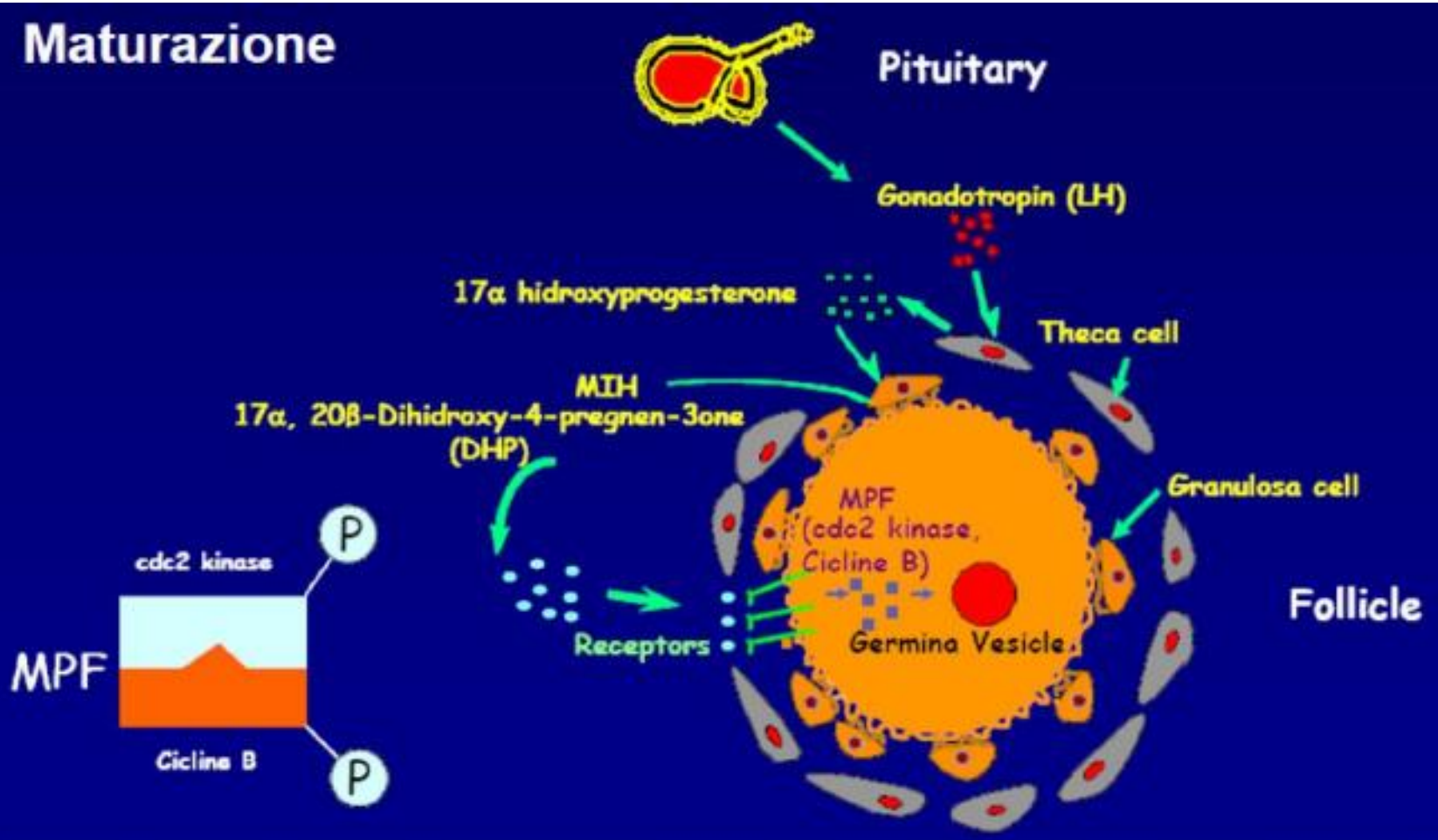




L'azione della gonadotropina è mediata dalla produzione follicolare del 17-beta estradiolo sintetizzato da follicoli ovarici tramite un'interazione tra i due strati di cellule, la teca e la granulosa. Le cellule della granulosa rilasciano estradiolo, ma la sua produzione dipende dalla disposizione del precursore steroideo (testosterone) prodotto dalle cellule della teca. GHT-I (FSH-simile) agisce sui due strati di cellule (della granulosa e della teca) per stimolare la produzione di testosterone e la sua trasformazione in estradiolo, rispettivamente, attraverso un recettore e mediante la via cAMP-AC. In alcuni teleostei come Fundulus o Medaka, le cellule della granulosa sono i principali siti per la sintesi di steroidi, pertanto, in questo caso la partecipazione dei due tipi di cellule non è necessaria.


cholesterol
P450ssc
pregnenolone
3β-DH
Δ4,5-isomerase
P450c17
17- OH pregnenolone
progesterone
17,20 desmolase
3β-DH
Δ4,5-isomerase
P450c17
dehydroepiandro-
sterone (DHEA)
17- OH progesterone
3β-DH
Δ4,5-isomerase
17,20 desmolase
4-androstene -3,17- diol
4-androstene -3,17- dione
3β-DH
Δ4,5-isomerase
17- keto-
reductase
aromatase
estrone
17- keto-
reductase
aromatase
testosterone
estradiol
5α - reductase
dihydrotestosterone

Maturazione

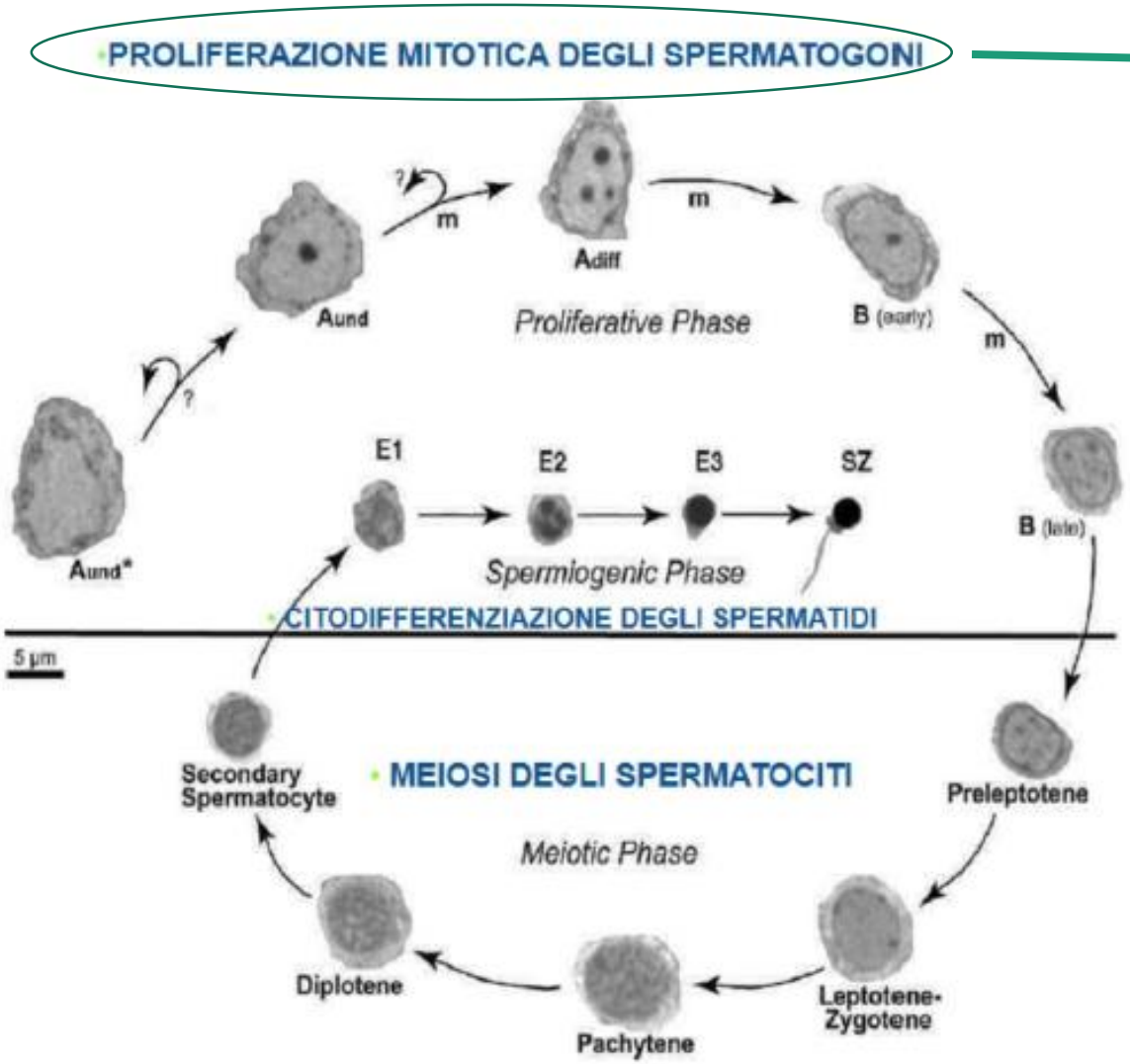


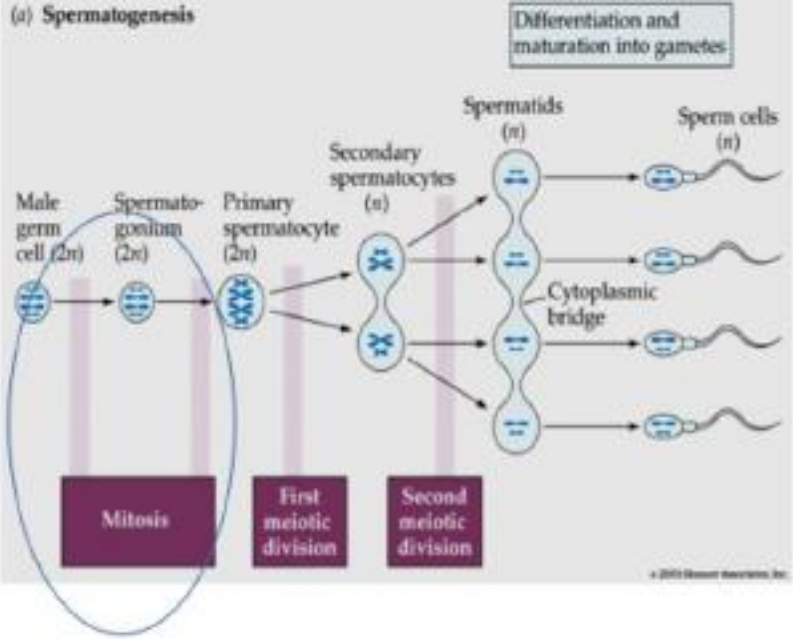
La maturazione consiste principalmente nel ripresa della meiosi ed il completamento della prima divisione meiotica e si ha anche la chiarificazione del tuorlo e l'incremento del volume degli oociti. La maturazione è regolata da 3 mediatori: GHTII, l'ormone inducente la maturazione (MIH) ed il fattore che promuove la maturazione (MPF). Il 17-alfahydroxyprogesterone viene prodotto dalle cellule della teca. Questo steroide diffonde nelle cellule della granulosa per essere convertito in 17alfa-20beta-diidrossi-4-pregnen-3, ovvero il MIH. Il MIH si lega ai suoi recettori di membrana (MIHR) il cui numero aumenta nella fase finale della maturazione. Ci sono evidenze che suggeriscono che il legame del MIH al MIHR inibisce l'attività dell'AC, il conseguente calo dei livelli di c-AMP attiva il MPF, che è direttamente responsabile nell'innescare la ripresa della meiosi. MPF è un complesso costituito nella cellula dalla cdc2-chinasi e la ciclina B. MIH induce gli ovociti a sintetizzare ex novo la ciclina B che a sua volta attiva la pre-esistente cdc2-chinasi attraverso fosforilazione a livello di treonina, con produzione di CD2-chinasi attiva.

Spermatogenesi e sua regolazione endocrina

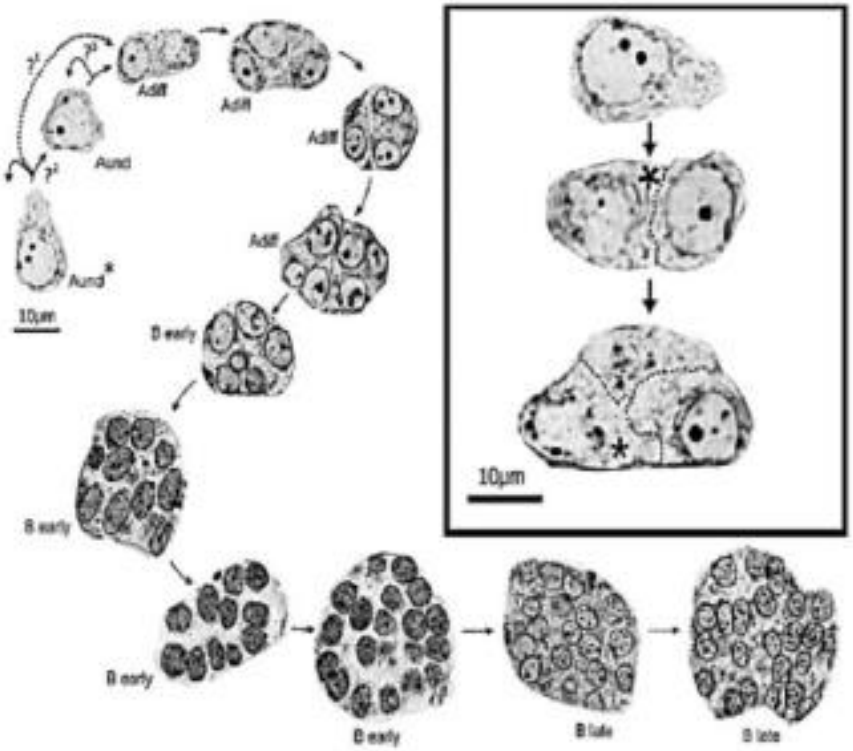
LA SPERMATOGENESI PUÒ ESSERE SUDDIVISA IN TRE FASI: .

Il numero delle generazioni di spermatogoni è specie specifico

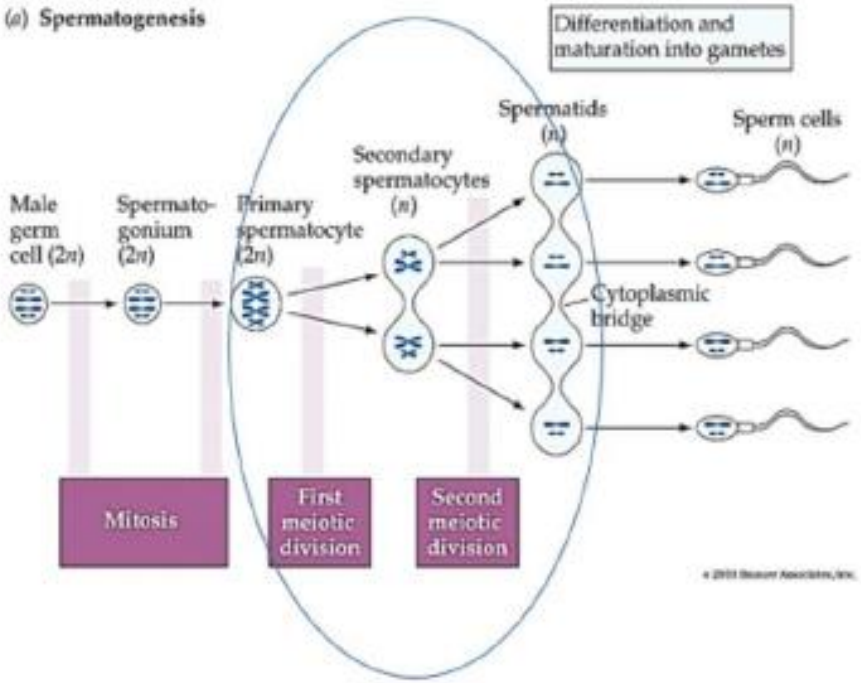




PROLIFERAZIONE MITOTICA DEGLI SPERMATOGONI

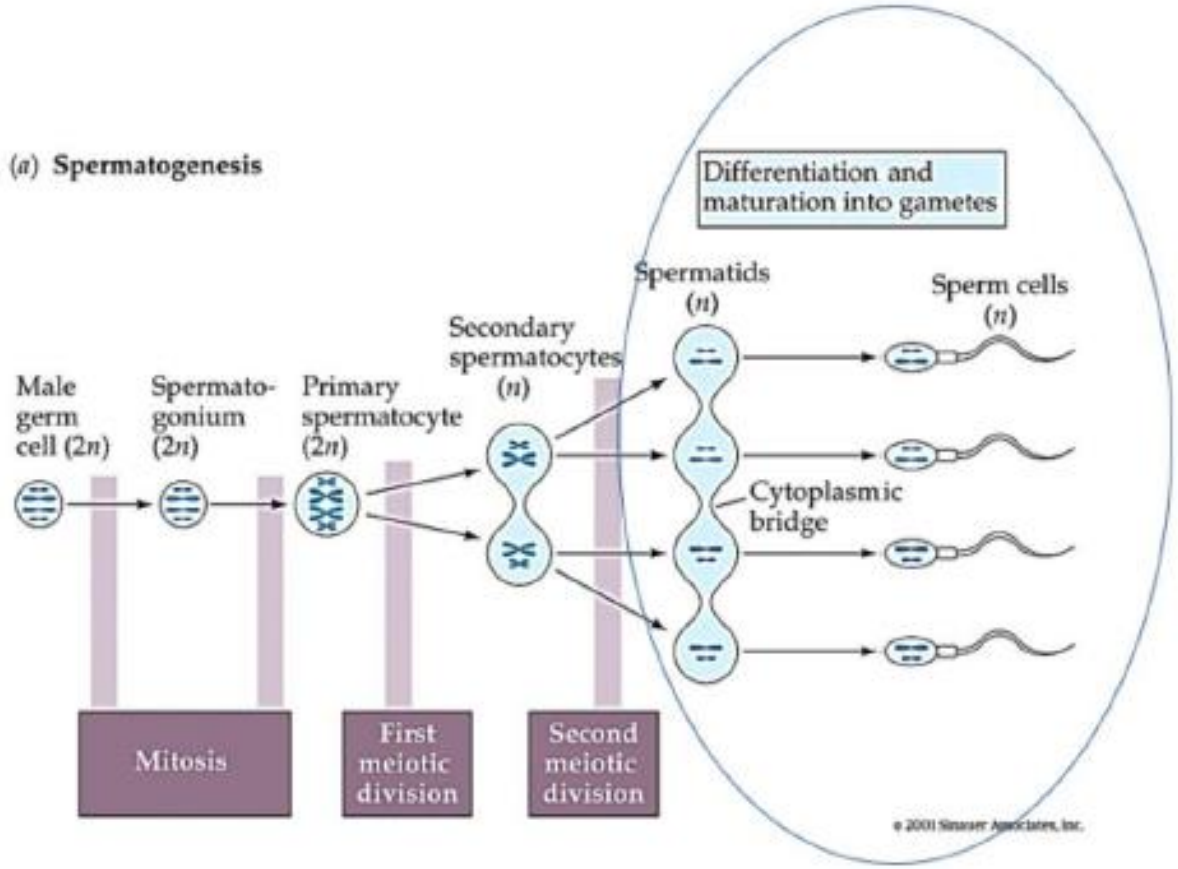


Il processo prende origine dall'attività proliferativa delle cellule staminali spermatogoniali, che danno origine o ad altre cellule staminali o a spermatogoni che sono soggetti a molti cicli cellulari, allo scopo di incrementare la popolazione cellulare germinale e fornire l'enorme numero di cellule richiesto durante la fertilizzazione. Nei pesci, le successive generazioni spermatogoniali mostrano graduali differenze morfologiche.



MEIOSI DEGLI SPERMATOCITI

Al termine delle divisioni mitotiche (il cui numero è determinato geneticamente gli spermatogoni B si differenziano in spermatociti primari che subiscono le due divisioni meiotiche



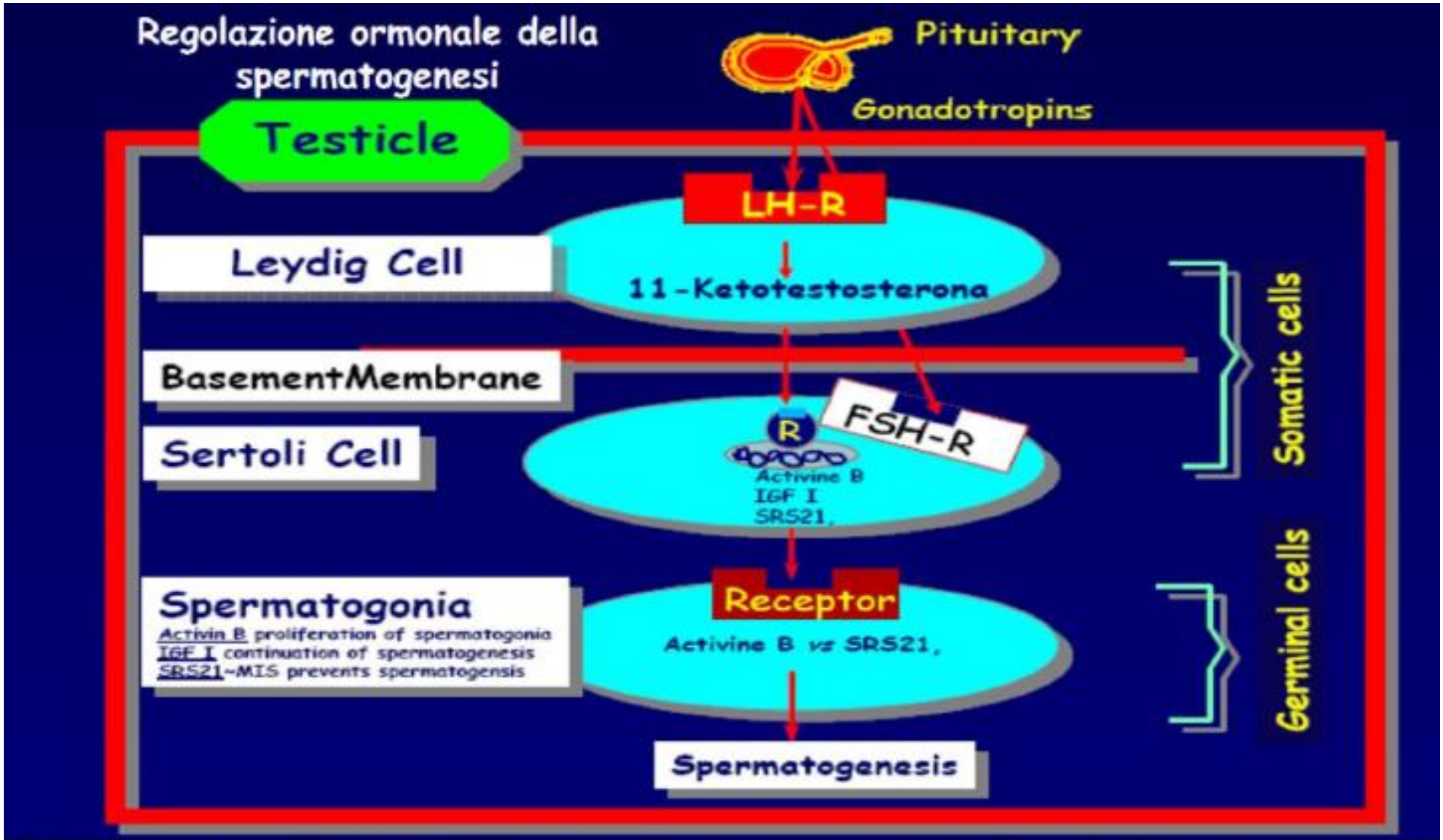
- CITODIFFERENZIAZIONE DEGLI SPERMATIDI

Durante tutte le fasi, le cellule germinali sono a stretto contatto con le cellule somatiche (cellule del Sertoli) perchè ne richiedono il supporto. Gli spermatidi aploidi subiscono la spermiogenesi e danno origine, senza successive divisioni agli spermatozi

SPERMIOGENESI

L'EVENTO CHE CARATTERIZZA ED IDENTIFICA LA SPERMIOGENESI È LA RIDUZIONE DEL CIRCA 80-90% DEL VOLUME NUCLEARE E CELLULARE. QUESTO È IL RISULTATO DELLA :

- CONDENSAZIONE MASSIMA DELLA CROMATINA,
- DISFACIMENTO DEL NUCLEOPLASMA NEL CITOPLASMA
- ESTRUSIONE DEL MATERIALE CELLULARE NEL LUME DELLE SPERMATOCISTI, MATERIALE CHE È POI FAGOCITATO DALLE CELLULE DEL SERTOLI,
- ACCUMULO IN POSIZIONE MEDIANA DI UN ENORME NUMERO DI MITOCONDRI
- SVILUPPO DEL FLAGELLO



La GHTII causa un aumento della secrezione di 11KT nelle cellule di Leydig. 11KT stimolare le cellule del Sertoli a produrre diversi mediatori quali Activina B ed il Fattore di crescita insulino-simile (IGF-I). L'Activina B induce la proliferazione degli spermatogoni, ma non la meiosi. Un altro membro della regolazione è SRS21, simile alla Sostanza inibente il dotto di Muller (MIS). Così sembra che la proliferazione degli spermatogoni è regolato da la rivalità tra Activin B e SRS21. Recettori FSH almeno nei mammiferi sono espressi nelle cellule di Sertoli e quindi l'FSH regola direttamente la loro funzione. Anche se nei pesci la situazione non è chiara si pensa che un importante ruolo della GHTI potrebbe essere quello di modulare il rilascio dei fattori di crescita da parte delle cellule del Sertoli.