

تأثیر لترازول بعنوان داروی مهار کننده آروماتاز بر تغییرات میزان برخی استروئیدهای جنسی در ماهی ماده بالغ و نابالغ زبرا (*Cichlosoma nigrofasciatum*)

طاهره ناجی^{۱*}، همایون حسین زاده صحافی^۲، محمد کریم جاذبی زاده^۳ و مرضیه مجیدی^۴

۱ و ۳ - دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی، تهران، ایران

۲ - موسسه تحقیقات شیلات ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۰۶/۳۰

تاریخ پذیرش: ۸۹/۰۹/۳۰

چکیده

در این تحقیق اثر داروی لترازول بعنوان مهار کننده آروماتاز بر تغییرات میزان استروئیدهای جنسی ماهی ماده زبرا بالغ و نا بالغ بررسی گردید. بدین منظور پس از کلر زدایی آب آکواریوم ها، ماهیان ماده بالغ با متوسط وزن ($0/32 \pm 0/5$) و نا بالغ ($0/15 \pm 0/5$) رها سازی شدند، آزمایش ها در ۸ گروه (۲ گروه تحت کنترل و ۶ گروه تحت تیمار) انجام شد. دوزهای مختلف لترازول ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن ماهی به صورت IM و به مقدار ۰/۰۰۱ میلی لیتر تزریق شد. تزریقات به مدت ۱۰ روز هر یکروز در میان انجام گرفت. هورمون های استرادیول و تستوسترون در گروه های آزمایشی اندازه گیری شد. بررسی نتایج حاصل از مقایسه سطح استروئیدها بین تیمار های مختلف نشان داد که در ماهیان بالغ تحت تیمار، میزان تستوسترون در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته و این افزایش در تیمار سوم بسیار بیشتر از دو تیمار دیگر بود ($0/62, 0/82 \mu\text{g/kg}$ ، $0/63, 0/4$). مقدار استرادیول در تیمارها کاهش یافت ($0/05, 0/16, 0/185, 0/2105 \mu\text{g/kg}$) که نشان دهنده عمل مهارتی داروی لترازول بود ($P < 0/05$).

واژگان کلیدی

مهار کننده آروماتاز، لترازول، استروئیدهای جنسی، ماهی زبرا

مقدمه

صنعت تکثیر و پرورش ماهیان زینتی مفرح و سود آور بوده و تجارت جهانی آن با میانگین سود سالیانه حدود ۱۴ درصد در حال افزایش است (Bartley, 2000). سالیانه حدود ۴۰۰۰ گونه ماهی آب شیرین و ۱۴۰۰ گونه ماهی آب شور در سطح بین المللی تجارت می شود (Wood, 2001). امروزه تجارت ماهیان زینتی یکی از بخشهای پر درآمد شیلات محسوب میشود که رفته رفته به صورت یک زیر بخش مستقل، حجم بالایی را در تجارت به خود اختصاص خواهد داد (Earle, 1995). در بین ماهیان زینتی آب شیرین، ماهی سیکلید گورخری یکی از زیبا ترین و

* مسئول مکاتبه: tnaji2002@gmail.com

پرطرفدارترین ماهیان هستند که بسیاری از ویژگیهای مربوط به سادگی تکثیر را در خود دارند. مطالعات نشان میدهد ۲۰۰۰ گونه از ۱۴۰ جنس در این خانواده وجود دارد که بعد از خانواده کپورماهیان و گاوماهیان سومین خانواده بزرگ ماهیان استخوانی است (Henseley & Courtenay, 1980). ماهی سیکلید گورخری دارای فلس های ریزی بوده و از لحاظ جثه، ماهی نسبتاً کوچکی است (Miller, 1966, Pannevis, 1993, Axelrod, 1971).

داروی لترازول در پزشکی برای جلوگیری از رشد و یا شکل گیری سرطان سینه در زنان استفاده می شود. نحوه و مکانیزم اثر این دارو به صورتی است که تبدیل آندروژن ها به استروژن را از طریق سیستم آنزیمی آروماتاز مهار می کند. علاوه بر این، تحقیقات نشانگر آن است که مصرف این دارو باعث افزایش میزان LH و FSH شده که به بالا بردن میزان ترشح تستوسترون طبیعی می انجامد (Elbercht & Smith, 1992). نیمه عمر دفعی و نهایی دارو در حدود ۲ روز می باشد و در انسان ضد نئوپلاسم بوده و با کاهش سطح استروژن ها منجر به کاهش توده تومور و تاخیر در پیشرفت رشد تومور در انسان می شود (Brodie, 1993)، اما در تاثیر آن بر آبزبان گزارشی موجود نمی باشد.

از آنجا که گنادها مهم ترین عضو تولید مثل در ماهیان هستند، بلوغ و تکامل آنها در تولید مثل و بقاء نسل در ماهیان از اهمیت ویژه ای برخوردار است لذا دژنره شدن دیواره اووسیت ها مانع از تکامل و رشد اووسیت ها و در نهایت مانع از تکامل و رشد گنادها و نابارور شدن آنها می شود و از سویی تغییر استروئیدهای جنسی (استرادیول و تستوسترون) نیز می تواند منجر به کاهش باروری گنادها و عدم تکامل و بلوغ آنها شود. با توجه به افزایش جمعیت و نیاز به توسعه صنعت آبی پروری، تحقیقات بر آبزبان امری ضروری است مطالعات گوناگون بر روی گونه های مختلف آبی نشان دهنده این مطلب است که داروی لترازول یک مهارکننده آروماتاز است و بر روی سطوح هورمونی برخی ماهی ها اثر مثبت و معنی دار و برخی دیگر اثر مثبت داشته ولی اختلاف معنی دار نمی باشد. نظر به اینکه تا کنون از تاثیر این دارو بر آبزبان اطلاعاتی کسب نشده است لذا هدف از این تحقیق، بررسی اثر لترازول بر تغییرات سطوح سرمی استرادیول و تستوسترون می باشد و از آنجایی که این دارو از تبدیل آندروژن ها به استروژن جلوگیری می کند در نتیجه احتمال می رود که با کاهش سطح استرادیول، میزان تستوسترون افزایش یابد که باعث تغییر جنسیت می گردد و از دستاورد این تحقیق می توان در کارگاه های تکثیر و پرورش ماهی استفاده نمود.

مواد و روش کار

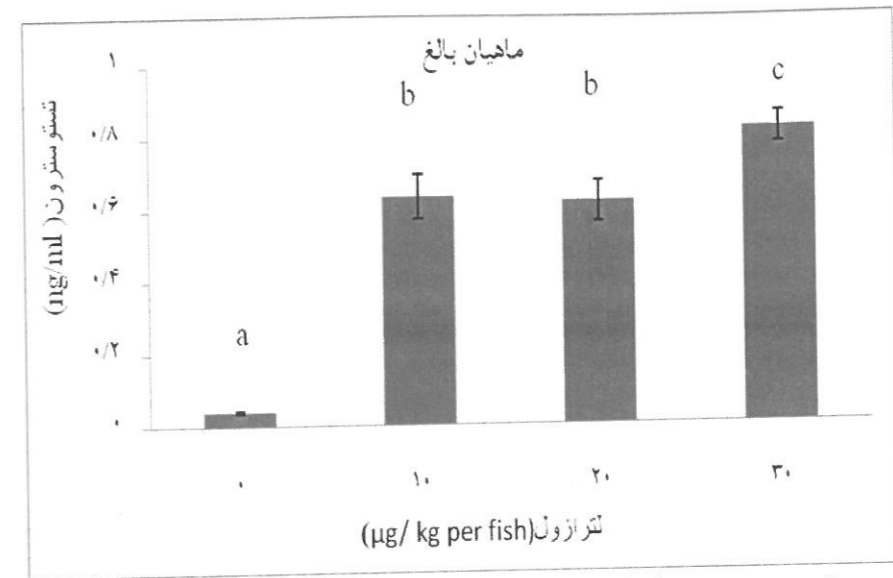
در این بررسی از ۲۰۰ قطعه بچه ماهی زبرا (*Cichlosoma nigrofasciatum*) که از یک گروه تکثیری انتخاب شده بودند، استفاده شد. ماهیان به ۱۲ آکواریوم پرورشی به ابعاد ۳۰×۴۰×۶۰ سانتی متر مکعب و حجم آب ۴۰ لیتر به تعداد ۱۰ قطعه در هر آکواریوم واقع در آزمایشگاه ماهی شناسی واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی انتقال داده شدند. در ابتدای آزمایش بچه ماهیان بیومتری شدند. وزن ماهیان بالغ ۰/۵±۰/۳۲ گرم، ماهیان نابالغ ۰/۱۵±۰/۵ گرم، طول ماهیان بالغ ۰/۲±۰/۲۳ سانتی متر و ماهیان نابالغ ۰/۲±۰/۱۸ سانتی متر بود و از ظاهر سالمی برخوردار بودند. پس از سازگاری اولیه به مدت ۴۸ ساعت و آداپته شدن آنها با غذای گیاهی غنی شده با ویتامین ها (Tetra vegetable) ساخت کشور آلمان، آزمایش ها در ۸ گروه (۶ گروه تحت تیمار با دوزهای مختلف لترازول ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن ماهی (Ramji et al., 2004) برای ماهیان بالغ و نابالغ بطور جداگانه و دو گروه کنترل (بدون تزریق و تزریق شده با دی کلرومتان) انجام گرفت آزمایش ها ۳ بار تکرار شد. فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب قبل از آزمایش، در طول آزمایش و در پایان آن اندازه گیری شد. درجه حرارت آب آکواریوم ها در طول دوره آزمایش ۰/۵±۰/۲۶ سانتی گراد، اکسیژن محلول (DO) ۰/۵±۰/۶۱ میلی گرم بر لیتر، pH ۷/۷-۷/۲ و سختی کل آب ۲۳۵ میلی گرم بر کربنات سدیم بود. طول دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت

روشنایی تنظیم گردید. داروی لترازول به صورت پودر و با درجه خلوص ۹۸ درصد ساخت شرکت Sun/India و حلالیت قابل قبول بر اساس USP تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. برای تزریق لترازول از حلال دی کلرو متان استفاده شد. پودر لترازول با ترازو (Mettler، ساخت کشور آلمان) (با دقت ۰/۰۰۱±) توزین گردید و در ۱۰ سی سی دی کلرو متان حل شد و به مقدار ۰/۰۰۱ میلی لیتر در هر نوبت با سرنگ همیلتون در زیر عضله باله پشتی به تیمارها و گروه شاهد تزریق شد. ماهیان تلف شده در طول آزمایش به صورت روزانه جمع آوری و اطلاعات مربوط به فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب ثبت گردید. مراحل زیست سنجی ماهیان شامل اندازه گیری طول با خط کش بیومتری و وزن با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم قبل از انجام آزمایش ها و پس از آن صورت گرفت. پیش از انجام بیومتری به منظور کاهش استرس، ۱۲ ساعت قبل از بیومتری ماهیان، غذا دهی قطع گردید با توجه به اینکه ماده بیهوشی MS222 دارای اثرات سمی می باشد (Marking, 1967) لذا از ماده PI222 (ساخت شرکت ایمن دارو) به عنوان ماده بیهوشی استفاده گردید (Soivio, 1975). بدین منظور دو قطره از داروی مذکور در یک لیتر آب حل گردید، مدت زمان بیهوشی ماهیان ۱۵ ثانیه بود. تزریقات در ۱۰ نوبت و به صورت یکروز در میان و در ساعت معینی (۱۰ صبح) انجام می گرفت. به منظور اندازه گیری سطوح استروئیدی هورمون های استرادیول و تستوسترون با توجه به کوچک بودن سایز ماهیان امکان انجام خون گیری وجود نداشت، لذا، بافت عضلانی ماهیان هر تیمار جداگانه له گردید و مایعات بافتی توسط دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه جداسازی گردید. جهت اندازه گیری هورمون های مذکور از کیت Immunotech (ساخت کشور آلمان، شماره سریال ۵۸۲۷۰۱) و روش رادیوایمنواسی (RIA) بر اساس واکنش رقابتی بین آنتی ژن نشان دار شده با تستوسترون و استرادیول و آنتی ژن موجود در نمونه سرم (تستوسترون یا استرادیول) جهت اتصال به آنتی بادی ضد تستوسترون یا ضد استرادیول موجود در فاز جامد استفاده شد. پرتو دهی حاصل از اتصال آنتی ژن نشان دار (تستوسترون یا استرادیول) با آنتی بادی فاز جامد با گاما کانتر (LKB، ساخت کشور فنلاند) اندازه گیری و پردازش شد. در ضمن برای استاندارد کردن روش از کالیبراتورهای Immunotech استفاده شد و بدین ترتیب مقادیر هورمون ها بر حسب نانوگرم بر میلی لیتر گزارش گردید.

طرح آزمایشی تحقیق به صورت تصادفی بود و تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد استفاده شد و پردازش داده ها در نرم افزار SPSS 16 انجام گرفت.

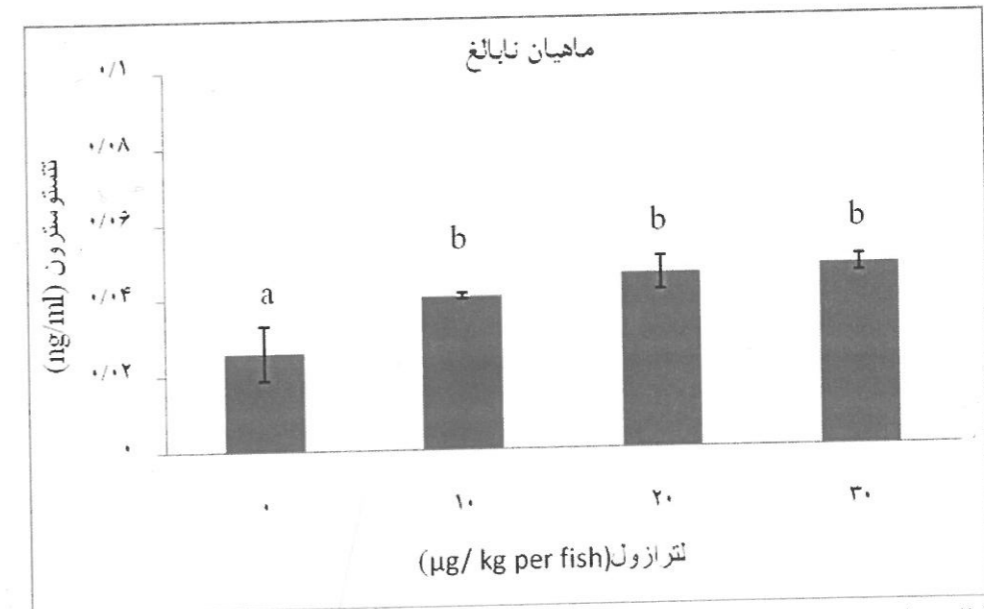
نتایج

پس از ۱۰ روز تزریق داروی لترازول، میزان تستوسترون ماهیان تحت تیمار بالغ در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت و بین تیمارها مقدار این هورمون در تیمار سوم با دوز ۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن در مقایسه با دو تیمار دیگر افزایش معنی دار داشت ($P < 0.05$) بین تیمار اول و دوم که مقدار ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن به آنها تزریق شده بود در مقایسه با یکدیگر ارتباط معنی داری مشاهده نشد ($P < 0.05$) (۰/۰۴، ۰/۶۳، ۰/۶۲، ۰/۸۲ $\mu\text{g/kg}$) (شکل ۱).



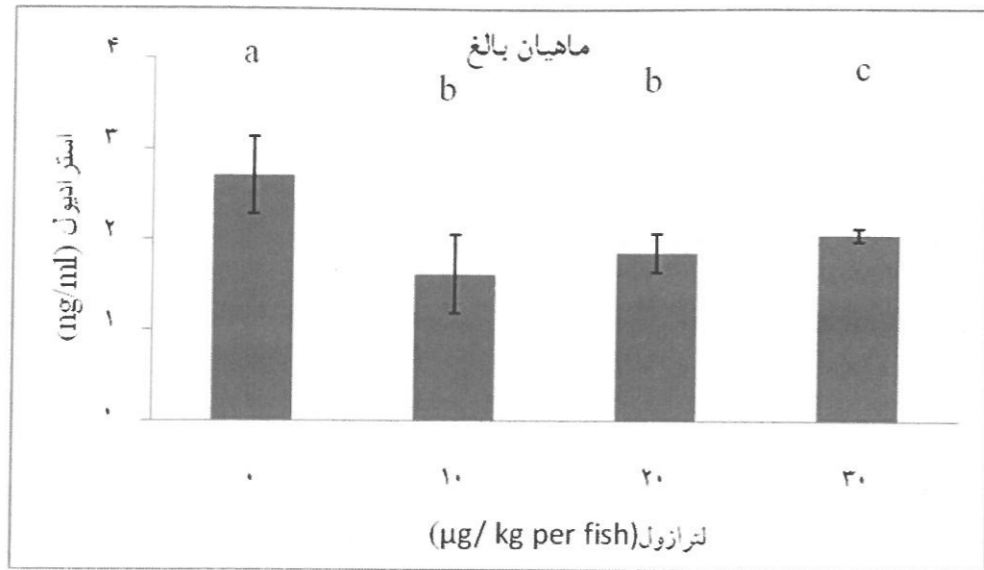
شکل ۱- سطح هورمون تستوسترون در ماهیان بالغ در دوزهای مختلف لترازول در مقایسه با گروه کنترل حروف متفاوت در شکل ها نشانگر وجود اختلاف معنی دار می باشد.

در ماهیان نابالغ بین هر سه تیمار در مقایسه با گروه شاهد مقدار تستوسترون افزایش یافت که این افزایش در مقایسه بین تیمارها معنی دار نبود ($P < 0.05$) ($0.025, 0.040, 0.046, 0.047 \mu\text{g/kg}$) (شکل ۲).



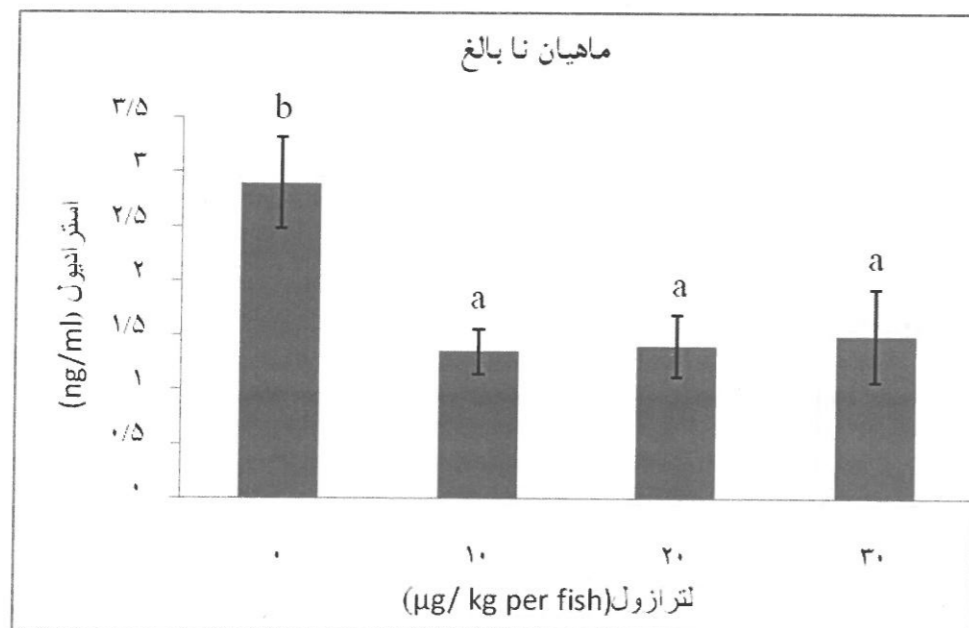
شکل ۲- سطح هورمون تستوسترون در ماهیان نابالغ در دوزهای مختلف لترازول در مقایسه با گروه کنترل

در ماهیان بالغ، گروه شاهد با توجه به جنسیت ماهیان (ماده) میزان استرادیول افزایش چشمگیری داشت که پس از تزریق داروی لترازول میزان استرادیول در تیمارها کاهش یافت که این کاهش سطح استرادیول در بین تیمارها معنی دار نبود ($P < 0.05$) ($2/7, 1/6, 1/85, 2/05 \mu\text{g/kg}$) (شکل ۳).



شکل ۳- سطح هورمون استرادیول در ماهیان بالغ در دوزهای مختلف لترازول در مقایسه با گروه کنترل

در ماهیان نابالغ، میزان استرادیول در گروه کنترل افزایش چشمگیری داشت که با تزریق داروی لترازول میزان استرادیول در تیمارها کاهش یافت ($P < 0.05$) ($2/3, 1/35, 1/4, 1/5 \mu\text{g/kg}$) (شکل ۴).



شکل ۴- سطح هورمون استرادیول در ماهیان نابالغ در دوزهای مختلف لترازول در مقایسه با گروه کنترل

بحث و نتیجه گیری

مقایسه ی نتایج حاصل از گروه شاهد در ماهیان بالغ با تیمارهای ۲، ۳ و ۱۰، ۲۰، ۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم لترازول دریافت کرده بودند نشان دهنده تاثیر داروی لترازول بر سطوح استروئیدی آنها می باشد که منجر به کاهش استرادیول و افزایش تستوسترون گردید و در مقایسه با ماهیان تحت کنترل اختلاف معنی داری را نشان داد. بررسی نتایج حاصل از گروه شاهد در ماهیان نابالغ با تیمارهای ۲، ۳ و ۱۰، ۲۰، ۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم لترازول دریافت کرده بودند نشان دهنده همین اثر در ماهیان نابالغ بود که بین سه گروه تیماری اختلاف معنی دار

وجود نداشت اما در مقایسه بین گروه شاهد و سه تیمار اختلاف معنی دار نشان داده شد. تاثیر داروی لترازول در سه تیمار ماهیان بالغ در مقایسه با سه تیمار تحت تیمار با لترازول در ماهیان نابالغ نشان دهنده این مطلب بود که تاثیر لترازول در دوز مشابه در ماهیان بالغ چشمگیر تر بود. در بررسی کلی تیمارها می توان به این نتیجه رسید که داروی لترازول با افزایش دوز تزریقی و به ماهیان بالغ و نابالغ، بر سطح استروئیدها تاثیر گذاشته و سطح هورمون های نرینگی را در ماهیان ماده بالا برده و سطح استرادیول را کاهش داد. نتایج این تحقیق با مطالعات بدست آمده بر تاثیر مهارکنندگی آروماتاز لترازول مطابقت دارد (Quinito, 1990).

Brodie در تحقیقی که در سال ۱۹۹۳ بر لترازول انجام داد بیان کرد که لترازول از تبدیل آندروژن ها به استروژن از طریق مهار سیستم آنزیمی آروماتاز عمل می کند و با کاهش سطح استروژن منجر به کاهش توده تومور سرطانی در زنان می شود. در بررسی مشابه که بر روی لترازول انجام شد لترازول مورد تایید FDA قرار گرفت و برای درمان منطقه ای سرطان سینه که متاستاز ایجاد شده بود مهم دانسته و بیان کرده که با کاهش استروژن از طریق یک اتصال رقابتی به هم در سیتوکروم P450 مانع فعالیت آروماتاز شده و می تواند از پیشرفت بافت توموری به خصوص در زنان یائسه جلوگیری کند. Keith و همکاران در سال ۲۰۰۹ تاثیر داروی لترازول را به عنوان یک مهارکننده آروماتاز بررسی کردند و اثر آن را در درمان نازایی در زنان مورد مطالعه قرار دادند نتایج حاصل نشان داد که لترازول با تحریک تخمک گذاری می تواند راهی برای درمان نازایی باشد و همچنین خطر نارسایی در تولد را کاهش می دهد به گونه ای که لترازول می تواند نقص های مادر زادی در عضوهای اصلی و ناهنجاری های کروموزومی در موارد القای تخمک گذاری را کاهش دهد. Wichman و همکاران در سال ۲۰۰۶ از اثر مهارکنندگی لترازول برای افزایش طول قد در دوران بلوغ در پسران استفاده کردند و طی تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که مهارکننده آروماتاز با افزایش تستوسترون و کاهش استرادیول می تواند طول قد را در پسرانی که در بلوغ تاخیر دارند، افزایش دهد.

در تحقیق حاضر جهت بررسی تاثیر داروی لترازول از مایعات بافتی استفاده گردید در حالی که در تحقیقی که Quinito و همکاران در سال ۱۹۹۰ برای استخراج استروئیدها در جنس نر ماهی قزل آلا ای اقیانوسی انجام دادند از بافت، تخم و لطف ماهیان استفاده شد. Sudha و همکاران در سال ۲۰۰۱ سطوح استروئیدی ۱۷ بتا استرادیول و پروژسترون را در بافت تخمدان و لطف خونی نوعی خرچنگ به نام *Scylla serrata* بررسی کردند و ارتباط آن را با مرحله زرده سازی سنجیدند و متوجه شدند که در شروع زرده سازی سطوح هر دو استروئید به شدت در بافتها افزایش یافته که سطح استرادیول بیشتر در هیپاتوپانکراس و سطح پروژسترون بیشتر در تخمدان زیاد شده است. در مطالعاتی که توسط Couch و همکاران در سال ۱۹۸۷ صورت گرفت و سپس در سال بعد توسط Van Beek و De Loof و پس از آن در سال ۱۹۸۹ توسط Fairs و همکاران صورت گرفت همگی برای سنجش استروئیدهای مهره داران از هیپاتوپانکراس، تخمدان و همولنف خانواده خرچنگ استفاده کردند و این مطالعات بیانگر این است که می توان برای سنجش سطوح استروئیدی از بافت و مایعات بافتی به جای خون استفاده کرد.

در مطالعاتی مشابه که Hobby & Pankhurst در سال ۱۹۹۷ بر روی دو نوع ماهیان دریایی *auratus* و *Pagrus Chromis dispilus* انجام دادند، با استفاده از پلاسمای ماهیان توانستند سطوح استرادیول را به عنوان یک شاخص مهم غیرمستقیم در زرده سازی اندازه گیری کنند و سطوح پروژسترون هم بالاترین سطح در زمان زرده سازی اندازه گیری شد.

در تحقیق حاضر تاثیر مهارکننده آروماتاز بر سطوح استروئیدهای جنسی ماهی بررسی گردید و افزایش تستوسترون و کاهش استروژن حاصل شد که در تحقیقاتی مشابه که توسط Ramji و همکاران در سال ۲۰۰۴ بر نوعی ماهی دریاهای گرمسیری به نام *Protogynous* صورت گرفت تاثیر مهارکننده آروماتاز را در تغییر جنسیت این

ماهی بررسی کردند و مشاهده کردند که سطح سرمی هورمون جنسی ۱۷ بتا استرادیول کاهش یافته و سطوح تستوسترون و ۱۱ کتو تستوسترون در بخش های تخمدانی ماهی ماده افزایش یافته و باعث تغییر جنسی کامل ماهی شده است. Eftthimia و همکاران در سال ۲۰۰۶ در تحقیقات خود اثر مهارکنندگی آروماتاز را بر بلوغ جنسی در ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salar salmo*) بررسی کردند. در این تحقیق مهارکننده آروماتاز را در داخل کپسول هایی قرار داده و کپسول ها را در بدن بچه ماهیان جای دادند که باعث تغییر وزنی تخمدان ماهیان ماده و افزایش نسبی ماهیان نر گردید و از سویی سطوح استروئیدی ماهیان ماده را تغییر داد که به صورت کاهش استرادیول و افزایش تستوسترون نمایان گردید. این یافته ها حاکی از این است که آروماتاز سازی اهمیت فیزیولوژیکی مهمی در مکانیزم های مختلف مورد تاثیر در تولید مثل ماهی سالمون دارد. در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۶ توسط Liwei و همکاران بر روی ماهی ژاپنی *Medaka (Oryzias latipes)* انجام دادند از داروی لترازول به عنوان مهارکننده آروماتاز استفاده کردند و لارو و تخم بارور شده ماهی را در معرض لترازول با دوزهای متفاوت قرار دادند و در نهایت مشاهده کردند هیچ لاروی از بین نرفت اما رشد تخمک ها کاهش یافته و میزان باروری ماهیان کم شد و در ماهیانی که دوز بالای لترازول را دریافت کرده بودند تخم ریزی متوقف شد. از سویی زمان خروج از تخم ماهیان بررسی گردید و به این نتیجه رسیدند که زمان خروج از تخم ماهیان افزایش یافته اما هیچ ناهنجاری مورفولوژیک مشاهده نشده است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که لترازول بر سطح هورمون های جنسی در ماهی تاثیر گذاشته و در ماهیان نابالغ پدیده بلوغ را تسریع نموده است و تاثیر این دارو در ماهیان بالغ نمایان تر بود و سطح هورمون تستوسترون افزایش بیشتری یافت و ماهیان نابالغ به سمت جنس نر گرایش نمودند.

منابع

- Axelrod, D. 1971. The ornamental fish trade and fish conservation. *Fish Biology Journal*, 37:53-69.
- Bartley, D. 2000. Responsible Ornamental Fisheries, *Aquaculture Newsletters No 24*. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Brodie, A. M. 1993. Aromatize, its inhibitors and their use in breast cancer treatment. *Pharmacology & Therapeutics Journal*, 60:501-505.
- Couch, E. F., Hagino, N. & Lee, J. W. 1987. Changes in estradiol and progesterone immunoreactivity in tissues of the lobster, *Homarus americ*, with developing and immature ovaries. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87A: 765-771.
- Earle, K. E. 1995. *The nutritional requirements of ornamental fish*. *Veterinary Journal*, 17 (Suppl. 1): 53-55.
- Eftthimia, A., Lan, M., Lngemar, B. & Bertil, B. 2006. Effects of aromatize inhibitors on sexual maturation in Atlantic salmon, *Salmo salar*, male parr. *Fish Physiology and Biochemistry*, 14(1):15-24.
- Elbercht, A & Smith, R. G. 1992. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science*, 255:467-470.
- Fairs, N. J., Evershed, R. P., Quinlan, P. T. & Goad, L. J. 1989. Detection of unconjugated and conjugated steroids in the ovary, eggs, and haemolymph of the decapod crustacean, *Nephrops norvegicus*. *Gen & Comp. Endocrinol Journal*, 74: 199-208.
- Hensley, D. A. & Courtenay, J. 1980. *Cichlasoma nigrofasciatum* (Gunther) Convict Cichlid. Page 767 in: Lee. D. S., Gilbert. C. R., Hocutt, C. H., Jenkins, R. E., McAllister, D. E. And J. R. Stauffer, Jr. *Atlas of North American Fresh Water Fishes*. Publication of the North Carolina biological survey. North Carolina State Museum of Natural History. USA.

- Hobby, A. C. & Pankhurst, N. W. 1997. The relationship between plasma and ovarian levels of gonadal steroids in the repeat spawning marine fishes *Pagrus auratus* (Sparidae) and *Chromis dispilus* (Pomacentridae). *Fish Physiology and Biochemistry*, 16(1): 65-75.
- Keith, J., Ethan, D. G. & Kirk, C. 2009. Use of the aromatase inhibitor letrozole to treat male infertility. *Fertility and Sterility Journal*, 92 (2):829.
- Liwei, S., Jinmiao, Z., Philip, A.; Spear, J. & Zijian, W. 2000. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 40(3):239-243.
- Marking, L. L. 1967. Toxicity of MS₂₂₂ to selected fishes. Investigation in fish control. United States Department of the Interior Fish and Wildlife, Washington DC.
- Miller, R. R. 1966. Geographical distribution of Central American freshwater fishes. Miscellaneous Publication. USA.
- Pannevis, M. C. 1993. Nutrition of Ornamental Fish. In: Burger, A. H. (Ed), *The Waltham Book of Companion Animal Nutrition*. Pergamon Press, Oxford.
- Pankhurst, N. W. and Barnett, C. W. 1993. Relationship of population density, territorial interaction and Plasma levels of gonadal steroids in spawning male demoiselles *Chromis dispilus* (Pisces:Pomacentridae). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 90: 168-176.
- Quinito, A., Tamaru, C. S., Trick, C. C. & Fitzgerald, W. G. 1990. Effects of the aromatase inhibitor fedrozole on reproductive steroids and spermiation in male coho salmon during sexual maturation. *Aquaculture*, 188:175-187.
- Ramji, K., Mikihiko, B., Shigeo, N. & Masaru, N. 2004. Aromatase inhibitor induces complete sex change in the protogynous honeycomb grouper (*Epinephelus merra*). *Physiology Biochemistry. Molecular Reproduction and Development*, 67(3): 303-307.
- Soivio, A., Nyholm, K. & Huhuti, M. 1975. Effect of anesthesia with MS₂₂₂ and Benzocaine of the blood constituents of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, *Journal of Fish Biology*, 10: 91-101.
- Sudha, R., Warriar, R., Tirumalai, T. & Subramoniam, A. 2001. Occurrence of vertebrate steroids, estradiol 17 β and progesterone in the reproducing females of the mud crab *Scylla serrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 130(2): 283-294.
- Van Beek, E., De Loof, A., Novak, F. & Lambert, J. 1988. Pregnenolone and estradiol identification in the brine shrimp, *Artemia* sp., by means of gas chromatographical-mass spectrometrical analysis. *Aquaculture*, 89(1): 83-99.
- Verlhac, V., doye, N., Gabaudan, A., Troutaud, J. & Deschaux, D. P. 1993. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants: pathological and physiological significance. *fish Nutrition in practice*, 61: 167-177.
- Wichman, S., Hero, M. & Dunkel, L. 2006. Inhibition of P450 Aromatase Enhances Gonadotropin Secretion in Early and Midpubertal Boys: Evidence for a Pituitary Site of Action of Endogenous E. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(10): 4887-4894.
- Wood, E. M. 2001. Collection of coral reef fish for aquaria: global trade. In: conservation issues and management strategies. Marine Conservation Society, UK.