

Inducción de la vitelogénesis mediante FSH y LH específicas en lubina

I. Giménez¹, F. de la Gándara², M. Arizcun², P. Baixauli², A. Ortega² y A. García-Alcázar²

¹Rara Avis Biotec S.L. C./ Moratín 14,4º. 46002 Valencia. España. E-mail: igimenez@raraavis-bio.com

²Instituto Español de Oceanografía. Planta de Cultivos Marinos. Carretera de la Azohía s/n 3860 Puerto de Mazarrón. Murcia. España.

Abstract

In teleosts, vitellogenesis is under the control of adenohipophyseal gonadotropins (FSH and LH). The biological effect of these hormones takes place in both vitellogenesis (early-, mid- and late) for FSH, and final maturation and ovulation (LH). In the present work we analyze the *in vivo* effects of recombinant specific FSH and LH (rdFSH y rdLH) on sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under gonadal regression. Administration of different doses of rdFSH during four weeks and a combination of rdFSH and rdLH four more weeks resulted on increases in gonadal weight, gonadosomatic index, and plasmatic estradiol-17 β concentration compared to the control group. In addition, the histological observation showed the presence of oocytes on advanced stage of vitellogenesis and an increase on the oocyte diameter in the groups treated with rdFSH y rdLH. These results suggest that administration of specific recombinant gonadotropins is effective for induction of vitellogenesis in sea bass.

Resumen

El proceso de vitelogénesis en teleosteos se halla bajo el control de las gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH). La actividad biológica de estas hormonas tiene lugar tanto en las fases iniciales, medias y avanzadas de la vitelogénesis (FSH), como en la maduración final y ovulación (LH). En este trabajo, analizamos los efectos *in vivo* de FSH y LH recombinantes específicas (rdFSH y rdLH) en lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) en estado de regresión gonadal. La administración de diferentes dosis de rdFSH durante cuatro semanas, y una combinación de rdFSH y rdLH durante cuatro semanas más resultó en incrementos de peso gonadal, índice gonadosomático y concentración de 17 β -estradiol plasmático respecto al grupo control. Además, el estudio histológico puso de manifiesto la presencia de ovocitos en estadio de vitelogénesis avanzada y el incremento del diámetro ovocitario en los grupos tratados con rdFSH y rdLH. Estos resultados indican que la administración de gonadotropinas recombinantes específicas de lubina es eficaz en la inducción de la vitelogénesis en lubina.

Justificación.

Uno de los factores limitantes para la diversificación de especies en acuicultura de teleosteos es la dificultad, en determinadas especies de interés industrial, para la obtención de puestas viables en condiciones de cultivo. Mientras la maduración final ovocitaria y la espermiogénesis son susceptibles de inducción mediante GnRH y otros preparados hormonales gonadotropos, la inducción de los procesos gonadales previos (vitelogénesis y espermatogénesis) requiere el desarrollo de tecnologías no disponibles hoy día. El análisis de la concentración plasmática de FSH y LH a lo largo del ciclo reproductivo en teleosteos sugiere que la FSH posee un importante efecto inductor de la vitelogénesis temprana-media (Molés *et al.*, 2012), mientras que el efecto de la LH tiene lugar en las fases finales de la vitelogénesis y maduración final ovocitaria (Rocha *et al.*, 2009). Con la finalidad de explorar las posibilidades de inducción de las fases vitelogénicas en periodo de regresión gonadal en lubina, hemos desarrollado FSH y LH recombinantes específicas y evaluado su efecto biológico en estas condiciones.

Material y métodos.

Ejemplares hembra de lubina (n=60; 201,2 \pm 19,1 g) de 22 meses de edad, criados en las instalaciones del IEO (Centro Oceanográfico de Murcia, Planta de Cultivos de Mazarrón) fueron distribuidos en el mes de febrero en cuatro grupos experimentales (A, B, C y D) y dos réplicas por tratamiento en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura. FSH y LH (rdFSH y rdLH) recombinantes de cadena única (fusión en monómero de las cadenas α y β respectivas) fueron obtenidas mediante transfección de una línea celular de mamífero (CHO), purificación parcial y concentración (Rara Avis Biotec S.L.). Los ejemplares de los grupos B y C recibieron, durante las cuatro semanas iniciales –comenzando el 5 de marzo–, dosis semanales de 1 μ g y 2 μ g de rdFSH respectivamente (vía intramuscular). Los ejemplares del grupo D recibieron durante este periodo dos dosis, una cada dos semanas, de 4 μ g de rdFSH (dosis total equivalente al grupo C). Durante las cuatro semanas siguientes se repitió el protocolo de administración de rdFSH y se añadió una dosis de 2 μ g de rdLH semanal a cada ejemplar de los grupos B, C y D. El grupo control (A), recibió dosis semanales de suero salino. Tres semanas antes del inicio del tratamiento (febrero, 2015) se realizó un muestro de peces del mismo stock (M0). Tras las cuatro primeras semanas de tratamiento con rdFSH se realizó el muestro M1, y tras las cuatro semanas de tratamiento con rdFSH + rdLH se realizó el muestro M2. Para cada individuo se registró el peso somático y gonadal para el cálculo del IGS, se obtuvo muestra de sangre para determinación de 17 β -estradiol plasmático (kit ELISA comercial) en M1 y M2; y se obtuvo una muestra de la región media del ovario para procesamiento histológico (Bouin, parafina, Hematoxilina-eosina) y medición del diámetro ovocitario en los ovocitos de mayor tamaño (n=100) de cada preparación (M2). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía del programa Statgraphics Centurion XVI.

Resultados y discusión

La evolución de IGS y 17- β estradiol se representa en la Figura 1. En M2, el incremento de IGS en los grupos B, C y D respecto a control (A) es estadísticamente significativo. Sin embargo, los valores de IGS no alcanzaron la magnitud de los valores en el muestro M0 previo al tratamiento (actividad gonadal estacional). La concentración de 17 β -estradiol plasmático se incrementó en M2 (grupos B,C y D) respecto a M1 y control. La explicación a este fenómeno puede deberse a la duración del tratamiento, insuficiente para la recuperación de valores de IGS, y

suficiente para que la concentración plasmática de 17β -estradiol alcance valores propios de la especie durante la vitelogenénesis.

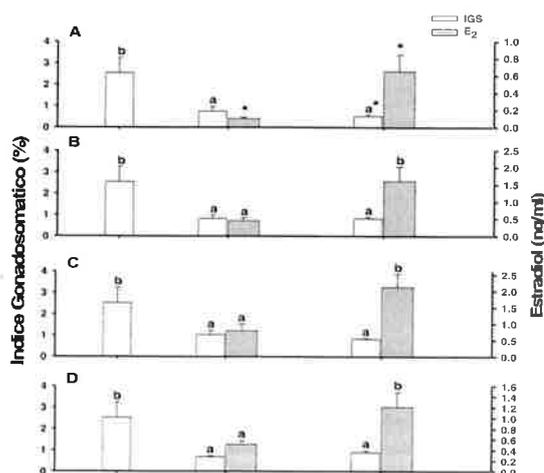


Figura 1. IGS y 17β -estradiol durante el tratamiento con FSH/LH. Grupos A, B, C y D. Letras indican diferencias entre muestreos. Asteriscos indican diferencias entre grupos.

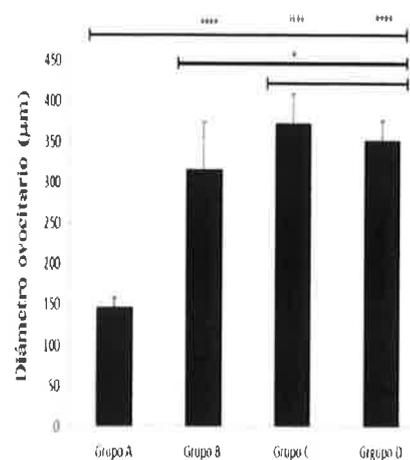


Figura 2. Diámetro ovocitario medio. M2. Grupos A, B, C y D.

El diámetro ovocitario medio fue significativamente mayor en los grupos C ($349,1 \pm 38,9SD$); D ($316,9 \pm 37,2SD$) y B ($277,8 \pm 57,8SD$) que en el grupo control A ($137,1 \pm 9SD$). En cuanto a su clasificación morfológica, los ovocitos de los grupos B, C y D se encontraban en fase de crecimiento secundario (*Primary-Secondary yolk granule stage*), mientras los del grupo control (A) presentaban características propias de las categorías de estadio perinucleolar tardío y estadio de vesícula lipídica I.

Otros estudios son necesarios para mejorar esta metodología con la finalidad de inducir y completar la vitelogenénesis en especies de interés en acuicultura y que experimentan bloqueo de esta fase del ciclo reproductivo en condiciones de cultivo.

Bibliografía

- Molés G, A. Gómez, M. Carrillo y S. Zanuy. 2012. Development of a homologous enzyme-linked immunosorbent assay for European sea bass FSH. Reproductive cycle plasma levels in both sexes and in yearling precocious and non-precocious males. *General and Comparative Endocrinology* 176(1):70-78.
- Rocha A, S. Zanuy, M. Carrillo y A. Gómez. 2009. Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass. *General and Comparative Endocrinology* 162(3):265-275.