

## Estudio preliminar sobre una posible inhibición dopaminérgica en la reproducción del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)

J.M. Guzmán<sup>1</sup>, A. García López<sup>2</sup>, M. Olmedo<sup>3</sup>, R. Cal<sup>3</sup>, O. Chereguini<sup>4</sup>, C. Sarasquete<sup>2</sup>, C.C. Mylonas<sup>5</sup>, J.B. Peleteiro<sup>3</sup> y E. Mañanós<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Acuicultura de Torre la Sal, CSIC, 12595 Ribera de Cabanes, Castellón, España. e-mail: evaristo@iats.csic.es

<sup>2</sup> Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, CSIC, 11510, Puerto Real, Cádiz, España.

<sup>3</sup> Instituto Español de Oceanografía, Centro de Cultivos, 36200 Canido, Vigo, España

<sup>4</sup> Instituto Español de Oceanografía, Centro de Cultivos, 39012 Monte-Cantabria, Santander, España.

<sup>5</sup> Hellenic Center for Marine Research, Institute of Aquaculture, Iraklion, Crete, Grecia.

### Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del sistema dopaminérgico sobre la reproducción del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Para ello, reproductores de lenguado senegalés nacidos y criados en cautividad (generación F1) fueron tratados con 1) GnRHa, 2) inhibidor dopaminérgico (pimozide) o 3) un tratamiento combinado (GnRHa + pimozide). El efecto de los tratamientos se evaluó a nivel de producción de huevos y espermatozoides (cantidad y calidad); además se estudió el efecto sobre niveles plasmáticos de esteroides sexuales y desarrollo gonadal (histología). Las hembras no mostraron una estimulación en la ocurrencia de puestas por el tratamiento combinado GnRHa + pimozide respecto a aquellas tratadas solo con GnRHa. Sin embargo, los machos que recibieron el tratamiento combinado mostraron una mayor estimulación en la producción de espermatozoides y en el grado de maduración testicular respecto a aquellos que recibieron solo GnRHa o pimozide. Los resultados indican que el sistema dopaminérgico no parece ejercer una acción fuerte sobre la ocurrencia de puestas en hembras, aunque podría estimular la espermiación en machos de lenguado senegalés.

### Abstract

Preliminary study on dopaminergic inhibition in Senegalese sole reproduction (*Solea senegalensis*)

The aim of the present study was to evaluate the effect of the dopaminergic system on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reproduction. For this purpose, Senegalese sole breeders hatched and raised in captivity (F1 generation) were treated with 1) GnRHa, 2) a well-known dopaminergic inhibitor (pimozide) or 3) a combined treatment (GnRHa + pimozide). The effect of each treatment was determined by studying spawning occurrence and sperm (quantity and quality); in addition, effects on sex steroids levels and on gonadal development (histology) were also considered. Females did not show any improvement of spawning occurrence by combining GnRHa and pimozide respect to those females treated only with GnRHa. However, males which received the combined treatment showed a greater stimulation of sperm production and testicular maturity than those males treated with a single GnRHa or pimozide treatment. Our results indicate that dopaminergic system do not seem to play a strong action on eggs spawning in females, but may stimulate spermiation in Senegalese sole males.

### Introducción

El lenguado senegalés es una especie prioritaria para la diversificación de la acuicultura europea. Sin embargo, su cultivo está limitado por serios problemas en su reproducción, especialmente en animales nacidos y criados en cautividad (Cañavate *et al.*, 2005). Dichos ejemplares muestran en la mayoría de los casos ausencia total de puestas, y puntualmente ocurrencia de puestas erráticas, de mala calidad y sin fertilizar. Con el objetivo de solventar esta situación se han usado con mayor o menor éxito terapias hormonales de inducción a la puesta y a la espermiación basadas en

análogos de GnRH (GnRHa) (Guzmán *et al.*, 2005, Agulleiro *et al.*, 2007), sin embargo, y aunque los incrementos en la fecundidad son notables, los huevos siguen presentando tasas muy bajas de eclosión, limitando la obtención de larvas F2.

En algunas especies de peces se ha observado la acción de un sistema inhibitor (sistema dopaminérgico) que bloquea la reproducción, no solo la espontánea si no también la inducida por terapias hormonales. En estas especies se ha demostrado la efectividad de terapias hormonales combinadas con GnRHa e inhibidores del sistema dopaminérgico (Trudeau *et al.*, 2000; Mykolajczyk *et al.*, 2004).

El objetivo del presente estudio es comprobar si la actividad de un sistema dopaminérgico pudiera estar limitando la efectividad de los tratamientos con GnRHa en el lenguado senegalés. Para ello se usaron tratamientos con GnRHa y/o un conocido inhibidor de la dopamina (pimozide), evaluándose la ocurrencia de puestas, calidad de esperma, niveles plasmáticos de esteroides sexuales (estradiol y testosterona en hembras, y 11-ketotestosterona y testosterona en machos), e histología gonadal.

### Material y Métodos

Ejemplares de lenguado senegalés de 3 años de edad, nacidos y criados en cautividad (generación F1) fueron mantenidos en condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura en las instalaciones del IEO de Vigo. Previo al inicio de la experiencia todos los animales fueron distribuidos en tanques de 4000 l (sex ratio 1:1). Los tratamientos fueron los siguientes:

- CNT: Control, inyección con suero salino (0.9% NaCl; 0.25 ml kg<sup>-1</sup>) a días 0 y 24.
- GnRHa: Implante GnRHa (50 ìg kg<sup>-1</sup>), día 0 + Inyección GnRHa (15 ìg kg<sup>-1</sup>), día 24.
- PIM: Inyección con pimozide (Sigma; 5 mg kg<sup>-1</sup>), días 0, 10 y 24.
- COMB: Tratamiento combinado de los dos anteriores.

Para la implantación se usaron implantes de liberación sostenida de GnRHa (EVAc, Mylonas y Zohar, 2001). Todos los tratamientos se aplicaron por duplicado (dos tanques por tratamiento). Uno de los duplicados se destinó al estudio exclusivo de la ocurrencia de puestas (“tanques sin muestrear”), mientras que el otro duplicado (“tanques muestreados”) se usó para el análisis de distintos parámetros detallados a continuación.

Se tomaron muestras de sangre a días 0, 10 y 25 post-tratamiento (p.t.). El análisis de volumen, densidad y movilidad del esperma se llevó a cabo los días 0 y 25 p.t. A día 10 p.t., con el fin de minimizar el estrés, tan solo se obtuvo el volumen mínimo de esperma suficiente para evaluar su densidad y movilidad. A día 25 p.t., 24 hr después de los últimos tratamientos, todos los animales fueron sacrificados y tras la extracción de sangre y esperma, se obtuvieron muestras de gónada para histología. El procesado y análisis histológico se hizo según García López *et al.* (2006). Los niveles plasmáticos de estradiol, testosterona y 11-ketotestosterona se analizaron mediante ELISA desarrollado y validado previamente para lenguado senegalés (Guzmán *et al.*, 2005). La ocurrencia de las puestas fue evaluada diariamente mediante un colector. Como medida de calidad de las puestas, se evaluó la flotabilidad de las puestas y una muestra de huevos flotantes se observó al binocular para comprobar la existencia de fecundación.

### Resultados

La fecundidad relativa total se muestra en la figura 1. Ni en el duplicado sin muestrear, ni en el duplicado muestreado se registraron puestas en los animales CNT. La respuesta entre tratamientos fue variable siendo siempre superior en aquellos tratamientos en los que participó el GnRHa (grupo GnRHa y COMB). No se registraron diferencias significativas en la fecundidad relativa diaria entre grupos ( $P > 0.05$ ). No se observó fecundación en ninguna de las puestas.

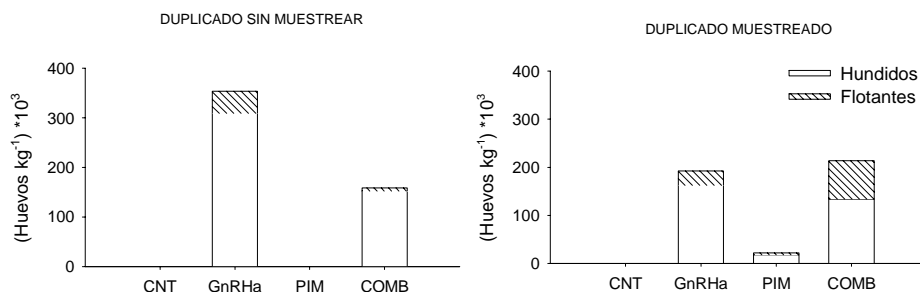


Figura. 1. Fecundidad relativa total del grupo control de puestas (izquierda; no muestreado) y endocrino (derecha; muestreado para la obtención de plasma y esperma).

Las características del esperma se muestran en la figura 2. Se observó una estimulación del volumen de esperma (respecto al grupo CNT) en todos los grupos, siendo significativa en los grupos PIM y COMB ( $P < 0.05$ ) (figura. 2A). La densidad espermática disminuyó a consecuencia de los tratamientos, siendo significativamente inferior al CNT en los grupos GnRHα y COMB ( $P < 0.05$ ) (figura 2B).

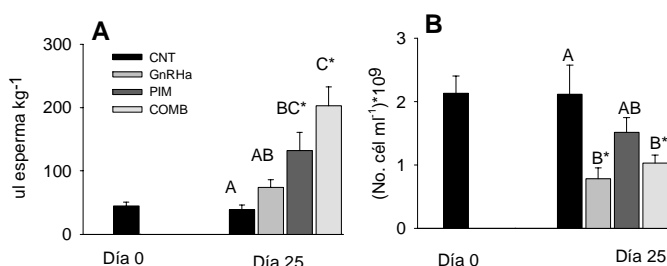


Figura. 2. Características espermáticas del experimento. Letras distintas significan diferencias significativas entre grupos al mismo día p.t. ( $P < 0.05$ ). El asterisco indica diferencias significativas con el muestreo a día 0 ( $P < 0.05$ )

A lo largo del periodo experimental se observó, en ambos sexos, una disminución progresiva en los niveles de esteroides. En hembras no se observó ningún efecto de los tratamientos, mientras que en los machos, solo el tratamiento con GnRHα mantuvo elevados los niveles de ambos esteroides ( $P < 0.05$ ).

El estudio histológico mostró, en general, una estimulación de la maduración gonadal por tratamiento con GnRHα en ambos sexos, siendo mayor en el grupo COMB. Ninguna hembra del grupo CNT mostró oocitos en estado de maduración, mientras que en los grupos PIM, GnRHα y COMB el porcentaje de hembras con oocitos maduros fue del 17%, 60% ( $P > 0.05$ ) y 80% ( $P = 0.015$ ), respectivamente. En machos, el porcentaje de individuos en estado de maduración funcional (García-López *et al.*, 2006) aumentó del 17% en CNT y PIM, al 50% en GnRHα ( $P > 0.05$ ) y 80% en COMB ( $P = 0.013$ ).

## Discusión

En el presente trabajo se ha estudiado, por primera vez, la posible influencia de una inhibición dopaminérgica sobre la reproducción del langostino senegalés. Se ha visto que, a nivel de puesta de huevos, la fecundidad fue similar en los grupos tratados con GnRHα o con tratamiento combinado (GnRHα + pimozide), a pesar de que las hembras de este grupo mostraron una mayor

proporción de oocitos en maduración. La falta de una estimulación a la puesta en aquellas hembras inyectadas con pimozide, hace suponer que no existe una inhibición dopaminérgica fuerte sobre la puesta de huevos, a diferencia de lo descrito en otras especies de peces (Mykolajczyk *et al.*, 2004).

Sin embargo, en machos, el tratamiento combinado resultó ser el más eficaz en la producción de esperma, con un incremento en el volumen total de esperma 5 veces superior al control, sin efecto aparente sobre su calidad. La densidad espermática, en el grupo combinado, solo disminuyó a la mitad con respecto a los controles, lo que indica que se produjo también un incremento en la producción de espermatozoides. Esto se corrobora con los estudios histológicos del testículo, que muestran una estimulación en la producción de esperma y en la maduración testicular. Los resultados observados en los machos tratados con GnRHa solo, indican estimulación pero en menor grado que en el grupo combinado, mientras que los controles y pimozide mostraron índices de maduración similares entre sí e idénticos a lo observado con anterioridad en poblaciones de machos cultivados (García-López *et al.*, 2006).

### Conclusiones

Por primera vez se ha evaluado la influencia del sistema dopaminérgico en la reproducción del lenguado senegalés. Se ha mostrado que no parece existir una inhibición dopaminérgica sobre la puesta de huevos, pero ésta podría afectar la maduración gonadal y la producción de esperma en los machos.

### Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el M.A.P.A. (proyecto JACUMAR, Plan Nacional de Cultivo de Lenguado 2006-2008) y el M.E.C. (proyecto del PN AGL2006-13777-C03). J.M.G disfruta una beca FPI del M.E.C. Agradecemos a B. Álvarez-Blázquez y C. Gómez su colaboración en la experimentación.

### Bibliografía

- Agulleiro M.J., A.P. Scott, N. Duncan, C.C. Mylonas y J. Cerdà. (2007). Treatment of GnRHa-implanted Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with 11-ketoandrostenedione stimulates spermatogenesis and increases sperm motility. *Comp. Biochem. Physiol.* 147A: 885-892.
- Cañavate, J.P., 2005. Opciones del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) para diversificar la acuicultura marina. *X Congreso Nacional de Acuicultura*. (Octubre, 2005, Gandía, España).
- García López, A., V. Fernández Pasquier, E. Couto, A.V.M. Canario, C. Sarasquete y G. Martínez Rodríguez. 2006. Testicular development and plasma sex steroid levels in cultured male Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147: 343-351.
- Guzmán, J.M., E. Marull, J. Ramos, C.C. Mylonas, V. Olmos y E. Mañanós. 2005. Inducción hormonal a la puesta del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) mediante la administración de sistemas GnRHa de liberación sostenida. *X Congreso Nacional de Acuicultura*. (Octubre, 2005, Gandía, España).
- Mikolajczyk, Chyb J., P. Szczerbik, M. Sokolowska Mikolajczyk, P. Epler, W.J. Enright, M. Filipiak y B. Breton. 2004. Evaluation of the potency of azagly-nafarelin (GnRH analogue), administered in combination with different formulations of pimozide, on LH secretion, ovulation and egg quality in common carp (*Cyprinus carpio* L.) under laboratory, commercial hatchery and natural conditions. *Aquaculture*, 234: 447-460
- Mylonas y Zohar. 2001. Use of GnRHa delivery system for the control of reproduction in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10: 463-491.
- Trudeau V.L., D. Spanswick, E.J. Fraser, K. Lariviere, D. Crump, S. Chiu, M. MacMillan, R.W. Schulz. 2000. The role of amino acid neurotransmitters in the regulation of pituitary gonadotropin release. *Fish. Biochem. Cell Biol.* 78: 241-59.