

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DEL LENGUADO  
SENEGALÉS (SOLEA SENEGALENSIS) : MECANISMOS  
ENDOCRINOS Y APLICACIONES EN ACUICULTURA

MARIA JOSEP AGULLEIRO GOZALBO

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 23 de Novembre de 2007 davant un tribunal format per:

- D<sup>a</sup>. Silvia Zanuy Doste
- D. José Pedro Cañavate Hors
- D. Juan Francisco Asturiano Nemesio
- D. Gonzalo Martínez Rodríguez
- D. Rubén Artero Allepuz

Va ser dirigida per:  
D. Joan Cerdá Luque

©Copyright: Servei de Publicacions  
Maria Josep Agulleiro Gozalbo

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7000-1

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

# FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DEL LENGUADO SENEGALÉS (*Solea senegalensis*): MECANISMOS ENDOCRINOS Y APLICACIONES EN ACUICULTURA

**IRTA**  
RECERCA | TECNOLOGIA  
AGROALIMENTÀRIES



UNIVERSITAT  
D VALÈNCIA   
Facultat de Ciències Biològiques

**Tesis Doctoral**

**Maria J Agulleiro Gozalbo**

**junio 2007**

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES  
Departament de Genètica Molecular i Evolutiva



**FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DEL  
LENGUADO SENEGALÉS (*Solea senegalensis*):  
MECANISMOS ENDOCRINOS Y APLICACIONES  
EN ACUICULTURA**

Memoria presentada por Maria J Agulleiro Gozalbo para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Fdo.: Maria J Agulleiro Gozalbo

Sant Carles de la Ràpita, junio 2007

EL TRABAJO FUE DIRIGIDO POR EL DOCTOR JOAN CERDÀ LUQUE Y REALIZADO EN EL CENTRO DE ACUICULTURA IRTA (INSTITUT DE RECERCA I TECNOLOGIA AGROALIMENTARIA) DE SANT CARLES DE LA RÀPITA (TARRAGONA), Y CUMPLE CON TODOS LOS REQUISITOS EXIGIDOS POR LA LEGISLACIÓN VIGENTE.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Luque'.

Fdo.: Joan Cerdà Luque





**Agradecimientos**

*Mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, Joan Cerdà Luque, por su apoyo, su interés y su motivación que tanto han contribuido a mi formación científica.*

*Al Instituto Nacional de Investigación Agroalimentaria (INIA) por otorgarme una beca predoctoral que para nada he desaprovechado. A la Junta Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) del Ministerio Español de Agricultura y Pesca, así como al Centro de Referencia en Acuicultura de la Generalitat de Catalunya por financiar este trabajo.*

*A mis compañeros David Otero y Angele Tingaud por ayudarme siempre que los he necesitado.*

*A tots els meus companys de l'IRTA, pels bons moments compartits. A J. Lluís Celades, Noèlia Gras i Joaquín Canoura per ocupar-se'n tan bé de l'stock de reproductors, i als que tantes hores de treball dec. A les meves companyes becaries amb les quals vaig compartir els primers anys de tesi: Mercedes Fabra, Mar Huertas, Noèlia Carrasco, Gemma Giménez, i especialment a Mireia Villalta amb qui m'uneix una gran amistat.*

*A Olga Bellot, per poder confiar sempre en ella.*

*A Alicia Estévez, por sus buenos consejos.*

*A Ángel García López, cuya ayuda para el análisis de esteroides fue de un valor inestimable, así como a Gonzalo Martínez-Rodríguez por permitirme aprender en su laboratorio. También a Pedro Cañavate y Victoria Anguís con los cuales fue un verdadero placer colaborar.*

*To Sandy Scott and his wife Angela who treat me almost like a daughter, It was really a delight to work with you both. Also to Ioanna Kat-*

*siadaki and Matthew Sanders which show me an easier way to purify Vtg and help me to establish an ELISA.*

*Au Pr. Patrick Babin, à qui je suis très reconnu pour me recevoir dans son laboratoire avec les bras ouverts et me laisser travailler avec lui dans un but commun. À Michèle André qui a fonctionné très dur avec moi et m'a enseigné aussi beaucoup de choses. Je ne peux oublier jamais tout ça qu'elle a fait pour moi, ainsi comme je n'oublierai non plus le reste du laboratoire: Anja Knoll-Gellida, qui a toujours eu de bons conseils; Christophe Barthe, Jean Forgue, Sylvia Branchu et, naturellement, Sofia Morais.*

*A tota la meva família, però especialment a Álvaro, qui més m'ha recolzat durant aquests anys i sense el qual ara mateix no estaria escrivint aquestes lletres.*

<b>PRÓLOGO</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción General</b>	<b>3</b>
1.1. Fisiología de la reproducción de teleósteos	5
1.1.1. Las hormonas gonadotropinas	6
1.1.2. La reproducción en hembras	8
1.1.2.1. Estructura del ovario y de los folículos ováricos	8
1.1.2.2. La gametogénesis femenina: oogénesis	10
1.1.2.3. Crecimiento ovocitario: la vitelogénesis	12
1.1.2.4. Maduración y ovulación de los oocitos	16
1.1.2.5. La atresia folicular	18
1.1.3. La reproducción en machos	21
1.1.3.1. Estructura del testículo	21
1.1.3.2. Espermatogénesis, espermiogénesis y espermiación	24
1.1.3.3. Regulación endocrina de la espermatogénesis	26
1.2. La Acuicultura en España	29
1.3. El lenguado senegalés	30
1.3.1. Taxonomía y distribución geográfica de <i>S. senegalensis</i> (Kaup, 1858)	32
1.3.2. Morfología externa y biología en el medio natural	33
1.4. Cultivo en cautividad y control de la reproducción	35
1.4.1. Cultivo en cautividad	35
1.4.2. Inducción a la puesta y control de la reproducción	37
Figura Suplementaria, 1.1.	38
Figura Suplementaria, 1.2.	39
<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
<b>2. Caracterización molecular del receptor de vitelogenina (VtgR) y de la proteína de unión a ácidos grasos 11 (FABP11) en el lenguado senegalés (<i>Solea senegalensis</i>)</b>	<b>45</b>
2.1. Introducción	47
2.2. Material y métodos	50
2.2.1. Animales	50
2.2.2. Análisis histológico	51
2.2.3. Aislamiento de los ADNc de <i>vtg</i> y <i>fabp11</i> a partir de ovario de <i>Solea senegalensis</i>	51
2.2.4. Secuencias utilizadas	54
2.2.5. Análisis de las secuencias	58
2.2.6. Análisis “Northern blot”	59
2.2.7. Análisis RT-PCR	60
2.2.8. Hibridación in situ	62
2.2.9. RT-PCR cuantitativa a tiempo real	64
2.2.10. Análisis estadístico	66



2.3. Resultados	67
2.3.1. Caracterización molecular de las dos variantes de “splicing” del <i>vtgr</i> de <i>Solea senegalensis</i>	67
2.3.2. Caracterización molecular y relaciones filogenéticas de <i>fabp11</i> de <i>Solea senegalensis</i>	70
2.3.3. Expresión diferencial de <i>vtgr</i> y <i>fabp11</i> en tejidos de <i>Solea senegalensis</i> adulto	74
2.3.4. Localización celular de los transcritos de <i>vtgr</i> y <i>fabp11</i> en ovario	76
2.3.5. Expresión diferencial de <i>vtgr</i> , <i>βactina</i> y <i>fabp11</i> durante la ovogénesis evaluada por qPCR	80
2.4. Discusión	83
<b>3. Estudio del proceso de vitelogénesis en el lenguado senegalés (<i>Solea senegalensis</i>) durante el ciclo reproductor</b>	<b>91</b>
3.1. Introducción	93
3.2. Material y métodos	95
3.2.1. Animales	95
3.2.2. Obtención y purificación de Vtg de lenguado	96
3.2.3. Desarrollo de un ELISA heterólogo para la detección de Vtg plasmática en el lenguado	98
3.2.3.1. Validación de un anticuerpo monoclonal anti-Vtg	98
3.2.3.2. Procedimiento de ELISA	98
3.2.4. Análisis de esteroides	100
3.2.5. RT-PCR cuantitativa en tiempo real	101
3.2.6. Análisis estadístico	101
3.3. Resultados	102
3.3.1. Desarrollo de un ELISA para la detección de la Vtg del lenguado senegalés	102
3.3.2. Perfil estacional de estrógenos y vitelogenina en plasma	104
3.3.3. Expresión de <i>vtgr</i> durante la vitelogénesis evaluada por qPCR	107
3.4. Discusión	108
<b>4. Inducción a la puesta en cautividad del lenguado senegalés (<i>Solea senegalensis</i>).</b>	<b>113</b>
4.1. Introducción	115
4.2. Material y métodos	117
4.2.1. Manejo de reproductores	117
4.2.2. Protocolos experimentales para los tratamientos con GnRH $\alpha$	119
4.2.2.1. Inyecciones intramusculares de GnRH $\alpha$	119
4.2.2.2. Implantes de GnRH $\alpha$	120
4.2.3. Análisis de esteroides	122
4.2.4. Recolección de huevos y evaluación de la calidad de los gametos	124

4.2.5. Análisis histológico	125
4.2.6. Análisis estadístico	125
4.3 Resultados	126
4.3.1. Inducción a la puesta mediante inyección de GnRH <sub>a</sub>	126
4.3.2. Perfil de los niveles esteroides sexuales en plasma tras la inyección con GnRH <sub>a</sub>	129
4.3.3. Inducción a la puesta con implantes de GnRH <sub>a</sub>	132
4.3.4. Perfil de esteroides sexuales en plasma de machos y hembras implantados con GnRH <sub>a</sub>	137
4.3.5. Desarrollo testicular y producción de esperma en machos implantados con GnRH <sub>a</sub>	138
4.4. Discusión	139
5. <i>Estimulación de la espermatogénesis y aumento de la motilidad espermática en machos de lenguado senegalés (Solea senegalensis) mediante tratamientos hormonales</i>	<b>145</b>
5.1. Introducción	147
5.2. Material y métodos	150
5.2.1. Animales y tratamientos hormonales	150
5.2.2. Determinación de los niveles de esteroides en plasma y testículo	152
5.2.3. Análisis histológico	153
5.2.4. Determinación de la densidad y motilidad espermática	154
5.2.5. Análisis estadístico	155
5.3. Resultados	155
5.4. Discusión	163
<b>RESUMEN</b>	<b>169</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>177</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>179</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>197</b>
<u>Agulleiro MJ</u> , André M, Morais S, Cerdà J, Babin PJ. High transcript of fatty acid-binding protein 11 but not of vitellogenin receptor is correlated to ovaria follicle atresia in a teleost fish ( <i>Solea senegalensis</i> ). <i>Biology of Reproduction</i> (en prensa).	
<u>Agulleiro MJ</u> , Scott AP, Duncan N, Mylonas CC, Cerdà J, 2007. Treatment of GnRH <sub>a</sub> -implanted Senegalese sole ( <i>Solea senegalensis</i> ) with 11-ketoandrostenedione stimulates spermatogenesis and increases sperm mo-	

tility. *Comparative Biochemistry and Physiology* 147(4): 885-892.

Agulleiro MJ, Anguis V, Cañavate JP, Martínez-Rodríguez G, Mylonas CC, Cerdà J, 2006. Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. *Aquaculture* 257: 511-524.

## **Prólogo**

El presente trabajo se puede dividir en tres partes. En la primera parte, o Introducción General, se resume el estado actual de conocimientos sobre los mecanismos endocrinos implicados en la reproducción de teleósteos, y se introduce al lector en los beneficios y problemas de la acuicultura de peces planos, especialmente del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). En la segunda parte, Capítulos 2 y 3, se describen los cambios estacionales de las principales hormonas, moléculas y receptores que intervienen en el proceso de crecimiento ovárico en el lenguado. Y en la tercera parte, Capítulos 4 y 5, se diseñan y aplican métodos hormonales para controlar la reproducción del lenguado en condiciones de cautividad. El objetivo principal de la presente tesis ha sido profundizar en el conocimiento de la endocrinología de la reproducción en teleósteos, y particularmente en el lenguado senegalés. Esta especie posee actualmente un alto interés comercial para la acuicultura marina mediterránea, pero su fisiología reproductiva es todavía muy desconocida, lo que imposibilita mejorar su producción y calidad a nivel industrial. Por ello, el objetivo final de este trabajo ha sido desarrollar métodos para controlar la reproducción del lenguado en condiciones de cautividad los cuales puedan ser transferidos a la industria.



**1.**

## **Introducción General**



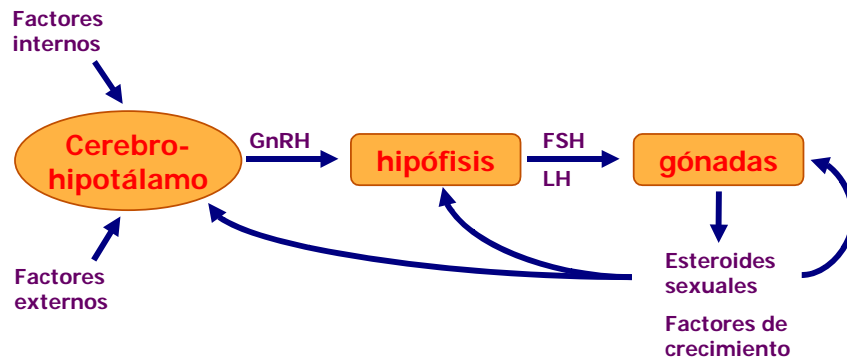


### **1.1. Fisiología de la reproducción de teleósteos**

La pubertad en teleósteos, como en mamíferos, viene marcada por la ovulación en hembras y la espermatogénesis en machos. Su aparición depende de estímulos internos (factores genéticos o reloj biológico, factores nutricionales, etc) y estímulos externos o ambientales (temperatura, fotoperiodo, feromonas, etc). Estos estímulos actúan sobre el hipotálamo desencadenando la síntesis de neurotransmisores, concretamente del neuropéptido liberador de las hormonas gonadotropinas (GnRH), que llega a la hipófisis o glándula pituitaria por inervación directa de las neuronas hipotalámicas de las células formadoras de gonadotropas: la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Ambas hormonas son secretadas al corriente sanguíneo y estimulan a las gónadas a través de receptores específicos para producir esteroides sexuales y factores de crecimiento, ambos con una importante función en la regulación de la reproducción. Estos factores pueden actuar sobre las gónadas directamente de forma paracrina o autocrina, o indirectamente a través de mecanismos de feedback sobre el hipotálamo o la hipófisis (Weltzien et al., 2004). En la Fig. 1.1. se muestra el esquema eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.

---

**Abreviaturas:** AMPc, Adenosín Monofosfato cíclico;  $17,20\alpha\text{P}$ ,  $17,20\alpha$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona; DTE, días tras la eclosión;  $\text{E}_2$ ,  $17\beta$ -estradiol; ELISA, “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”; FSH, hormona estimulante del folículo; FSHR, receptor de FSH; GnRH, neuropéptido liberador de gonadotropinas; GnRH $\alpha$ , análogo de GnRH; hCG, gonadotropina coriónica humana; IGS, índice gonadosomático; 11-KT, 11-ketotestosterona; Lc, células de Leydig; LH, hormona luteinizante; LHR, receptor de LH; LS, lóbulo seminífero; MIS, esteroide inductor de la maduración; 11-S (= 11-deoxicortisol),  $17,21$ -dihidroxi-4-pregnen-3, 20-diona; Sc, células de Sertoli; Spd, espermátidas; Sg, espermatogónias; Spz, espermatozoides; T, testosterona; TS, túbulo seminífero; TSH, hormona estimulante de la tiroides;  $20\beta\text{S}$ ,  $17,20\beta,21$ -trihidroxipregn-4-en-3-ona; VG, vesícula germinal; Vtg, vitelogenina; VtgR, receptor de Vtg.



**Fig. 1.1.** Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. GnRH es estimulada por factores externos y/o internos, siendo capaz de liberar la secreción de las hormonas gonadotropinas FSH y LH en la hipófisis. Al llegar a las gónadas vía sanguínea, las gonadotropinas estimulan la síntesis de esteroides sexuales y factores de crecimiento capaces de conseguir una regulación no sólo a nivel de gónadas, sino también a nivel de hipófisis y cerebro-hipotálamo.

#### 1.1.1. Las hormonas gonadotropinas

Las gonadotropinas FSH y LH pertenecen a la familia de las glicoproteínas, al igual que la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG). Estas glicoproteínas son heterodímeros que comparten la misma subunidad  $\alpha$ . La subunidad  $\beta$  es específica de cada hormona y confiere distinta función (Pierce y Parsons, 1981). En teleósteos, las dos gonadotropinas fueron identificadas por primera vez en el salmón (*Oncorhynchus keta*) e inicialmente llamadas GTH I y GTH II, pero tras comprobar que la base funcional y estructural era similar a FSH y LH de tetrápodos respectivamente (Suzuki et al., 1988a; Querat, 1995), esta terminología fue eliminada.

En las últimas dos décadas, las subunidades de FSH y LH han sido clonadas en varias especies de teleósteos (Sekine et al., 1989; Lin et al.,

1992; Kato et al., 1993; Rosenfeld et al., 1997; Yoshiura et al. 1997; Liu et al., 2001; Huggard-Nelson et al., 2002). Sin embargo, a pesar de que ambas moléculas poseen una estructura muy similar, son sintetizadas en células diferentes (Nozaki et al., 1990ab; Naito et al., 1991, 1993) y en diferentes estadios del ciclo reproductor (Naito et al., 1991). Así, FSH es sintetizada en las células de la periferia de la parte proximal de la pars distalis, mientras que LH se produce en las células de su parte central. La liberación de ambas está regulada directamente por la hormona GnRH en todos los vertebrados (Millar et al., 1997, 2001; Sealson et al., 1997; Fink, 1988; Peter y Yu, 1998), si bien hasta la fecha se han caracterizado múltiples formas de esta hormona (King y Millar, 1995; Millar et al., 1997 y 2001; Peter y Yu, 1997; White et al. 1998).

Tanto FSH como LH estimulan la producción de esteroides en el testículo y ovario de teleósteos (Suzuki et al., 1988b; Swanson et al., 1989; Van der Kraak et al., 1992; Planas et al., 1993 y 1995; Tanaka et al., 1995; Kagawa et al., 1998). Sin embargo, la función esteroidogénica de ambas sobre las gónadas depende del estadio de desarrollo de éstas, así, mientras que FSH y LH tienen una potencia esteroidogénica similar en fases tempranas de la gametogénesis (Suzuki et al., 1989b; Swanson et al., 1989; Van der Kraak et al., 1992; Planas et al., 1993, 1995 y 1997), LH es más potente que FSH durante las fases finales de ésta (Suzuki et al., 1988b; Planas et al., 1995 y 1997). En hembras, los niveles plasmáticos de ambas hormonas demuestran que durante la vitelogénesis (crecimiento oocitario), los niveles de FSH son elevados, mientras que los niveles de LH son muy bajos o inapreciables. En este estadio, el receptor de FSH (FSHR) se localiza en las células somáticas que rodean al oocito, células de la teca y de la granulosa (Yan et al., 1992; Miwa et al., 1994). Sin embargo, durante la fase final de madura-

ción de los gametos, los niveles plasmáticos de FSH disminuyen y los de LH aumentan paralelamente a la aparición de su receptor (LHR) en las células de la granulosa (Yan et al., 1992; Miwa et al., 1994). Los cambios plasmáticos de FSH y de LH durante la transición desde la vitelogénesis a la maduración son paralelos a los cambios plasmáticos de los dos esteroides ováricos más importantes,  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) y  $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ( $17,20\beta$ -P) respectivamente, que son producidos por estas células somáticas (Swanson et al., 1991; Oppen-Berntsen et al., 1994; Slater et al., 1994). De manera similar, en machos, FSH se encuentra relacionada con los estadios iniciales de la espermatogénesis, mientras que LH está relacionada con estadios finales de maduración y espermiación (Sprengel et al., 1990; Amsterdam et al., 1992 y 2002; Segaloff y Ascoli, 1993; revisados en Amsterdam y Rotmensch, 1987).

#### 1.1.2. La reproducción en hembras

##### 1.1.2.1. Estructura del ovario y de los folículos ováricos

Los teleósteos, a diferencia de los mamíferos, presentan gran variedad de estrategias reproductivas, incluyendo viviparidad, oviparidad y ovoviviparidad. En la mayoría de teleósteos el ovario es un órgano par, aunque en muchas especies ambas partes se fusionan en estadios muy tempranos del desarrollo para transformarse en un único órgano fusionado. El ovario está constituido por oogonias, oocitos, células foliculares que envuelven a éstos, tejido de soporte o estroma, y tejido vascular y nervioso. En la mayoría de teleósteos el ovario sufre cambios considerables de tamaño y apariencia a lo largo del ciclo, pudiéndose clasificar en tres tipos básicos según su patrón de desarrollo oocitario (Wallace y Selman, 1981; Nagahama, 1983 y 1995):

Ovario sincrono total: todos los oocitos se encuentran exactamente en el mismo estadio y las hembras mueren después de la puesta. Es el caso de muchos salmónidos.

Ovario sincrono por grupos: en el ovario se forman al menos dos poblaciones de oocitos en diferente estadio de desarrollo. Las especies con este tipo de ovario generalmente tienen varias puestas consecutivas por hembra a lo largo del periodo reproductivo. Es el caso de la dorada, la lubina, o el lenguado senegalés.

Ovario asincrono: durante el periodo reproductivo el ovario contiene la misma proporción de oocitos en todos los estadios de desarrollo, y por lo tanto, las hembras pueden reproducirse potencialmente todo el año. Es el caso de algunas especies de caballitos de mar (*Hypocampus* sp).

En teleósteos el ovario consta generalmente de una cavidad continua con el oviducto y los oocitos maduros son descargados a esta cavidad hacia el oviducto. En las especies ovíparas, se ha comprobado que la cavidad ovárica es como un almacén de huevos (oocitos ovulados) guardados temporalmente hasta el momento de la puesta. Esta importante función de almacenaje y posterior transporte hacia el oviducto en el momento de puesta es dependiente de ciertas hormonas sexuales (Takahashi y Takano, 1971).

Durante las primeras fases de desarrollo, el oocito es rodeado por una capa de células somáticas (Nakamura et al., 1993). Con el crecimiento del oocito, las células somáticas se multiplican formando una capa continua: la granulosa. Simultáneamente, el tejido conectivo que forma el estroma también se organiza para formar una capa externa a la envuelta folicular: la teca. Los oocitos vitelogénicos y postvitelogénicos quedan así envueltos por dos capas de distinta naturaleza: la capa externa o teca y la interna o granulosa, ambas separadas por una fina membrana basal. Externamente a la teca

también existe un epitelio. Este conjunto de capas somáticas + oocito es denominado folículo ovárico, asociación que finaliza durante la ovulación del oocito (Wallace, 1985; Swanson, 1991; Kobayashi, 1985; Cerdà et al., 1999). En el folículo ovárico se establece una comunicación química entre las células somáticas y el oocito, la cual parece que está mediada por zonas de contacto celular, como zonas adyacentes y uniones íntimas o “gap junctions” (Kobayashi, 1985; Cerdà et al., 1999).

En las especies vivíparas, como el guppy (*Poecilia reticulata*), se ha comprobado que los aspectos morfológicos del desarrollo del oocito, así como de la formación de la envuelta por capas somáticas, son los mismos que para las especies ovíparas, pero la fecundación es interna y los huevos fecundados son retenidos dentro del cuerpo de la madre hasta que se completa su desarrollo embrionario. Por tanto, en el ovario de las especies vivíparas ocurren algunas modificaciones estructurales para poder llevar a cabo el almacenaje del esperma y la fecundación interna; el contenido de proteínas del vitelo en el interior del huevo es menor, y los embriones dependen de un continuo suministro de nutrientes maternos. Por tanto, en estas especies, el ovario no sólo tiene una función gametogénica y endocrina, sino también nutritiva.

#### 1.1.2.2. La gametogénesis femenina: oogénesis

El primer estadio en el desarrollo de los gametos femeninos es la proliferación celular. En esta fase las oogonias entran en mitosis sufriendo varias divisiones celulares y comienza la meiosis, deteniéndose en el diplo-teno de la primera profase. Es en este momento, cuando los oocitos, a diferencia de los gametos masculinos, entran en una fase de crecimiento, que

varía según las especies, pero que en general se debe a la acumulación de proteínas complejas que formarán el vitelo (p.e., vitelogenina).

Varios criterios han sido seleccionados para definir morfológicamente el proceso de oogénesis en peces, principalmente: (i) tamaño, cantidad y distribución de las inclusiones celulares, sobretodo los gránulos de vitelo, y (ii) la morfología de los cromosomas. En 1965, Yamamoto et al. dividieron el desarrollo del oocito de la trucha en 8 fases según tamaño, apariencia del núcleo y sus nucleolos, y tipo y localización de sus inclusiones citoplasmáticas. De acuerdo a las descripciones de Wallace y Selman (1990) y Tyler y Sumpter (1996), se pueden definir los siguientes estadios en la oogénesis o formación del huevo en teleósteos: 1) estadio de crecimiento primario; 2) estadio de alvéolos corticales; fase temprana o tardía; 3) vitelogénesis primaria; 4) vitelogénesis secundaria; 5) vitelogénesis terciaria o maduración; y 6) atresia.

En el estadio de crecimiento primario, paralelamente al crecimiento del oocito, se produce un crecimiento del núcleo y la mayoría de los nucleolos empiezan a situarse alrededor de la periferia del núcleo (fase temprana del estadio 2). A lo largo del segundo estadio, se produce simplemente un crecimiento del oocito. Hasta aquí, los oocitos presentan un color acidófilo (azulado) en preparaciones histológicas teñidas con eosina/hematoxilina, y son considerados como estadios previtelogénicos o en vitelogénesis temprana.

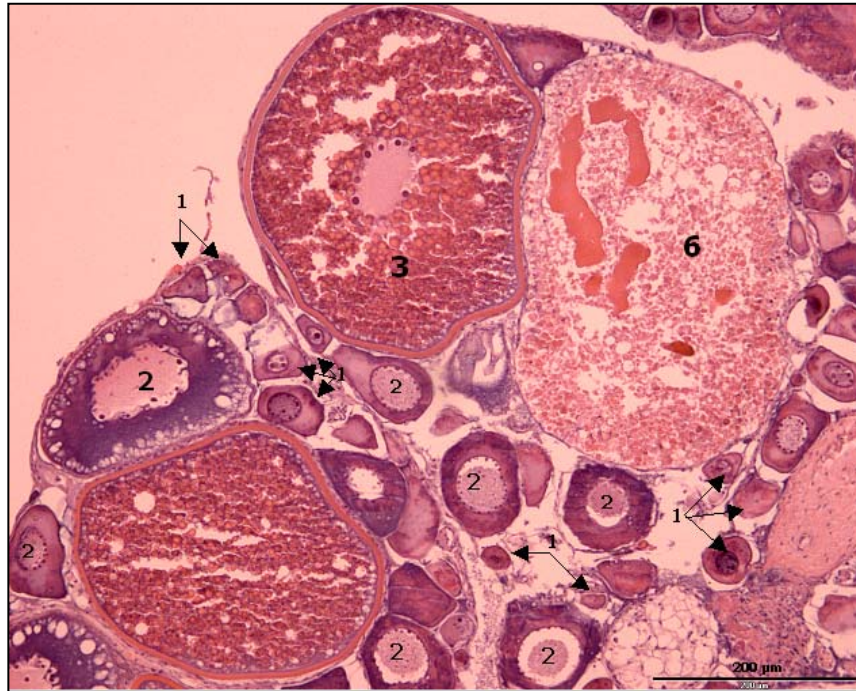
A partir de la vitelogénesis primaria se empiezan a formar los gránulos de vitelo y cuerpos de Balbiani, agregados juxtenucleares basófilos (rosados) en secciones histológicas. Estudios realizados mediante microscopio electrónico, revelan que los cuerpos de Balbiani no son estructuras homogéneas, sino que están formados por varios tipos de orgánulos celulares como



mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplasmático, pequeñas vesículas y gránulos lipídicos (Beams y Kessel, 1973; Guraya, 1979; Wallace y Selman 1990). La vitelogénesis primaria se caracteriza por el núcleo en posición central y un tamaño del oocito que aumenta progresivamente. El incremento de tamaño del oocito es prácticamente debido a la incorporación del precursor de las proteínas del vitelo, la proteína vitelogenina (Vtg). La Vtg es sintetizada en el hígado y transportada vía sanguínea hasta el ovario donde es incorporada a los oocitos en crecimiento. En *S. senegalensis* por ejemplo, un oocito inmaduro suele medir unas 50  $\mu\text{m}$ , pasando a medir más de 500  $\mu\text{m}$  en su momento de máximo crecimiento, antes del proceso de maduración. En la fase de maduración se produce la rotura de la membrana nuclear y la continuación de la meiosis. Si por algún motivo un oocito vitelogénico en estado avanzado o maduro no es ovulado, se produce el estado de atresia, mediante el cual el organismo reabsorbe el material almacenado en el oocito como mecanismo de ahorro energético. En la Fig. 1.2. se pueden observar algunos de los estadios descritos.

#### 1.1.2.3. Crecimiento ovocitario: la vitelogénesis

Para explicar la regulación endocrina del proceso de vitelogénesis en peces, se ha propuesto en salmónidos el modelo de dos-tipos-celulares (Nagahama, 1987b, 1995). En este modelo, las células de la teca bajo la influencia de FSH secretan testosterona (T) que es convertida a  $E_2$  en las células de la granulosa. La producción de T en la teca está mediada por un receptor de membrana capaz de reconocer la subunidad  $\beta$  de FSH. Dicho receptor, está acoplado a una adenilato ciclasa (Nagahama, 1987a, 1995; Kanamori y Nagahama, 1988; Kanamori et al., 1988), y la unión FSH-receptor conlleva un aumento intracelular de calcio y ácido arábídónico, y de la actividad de la

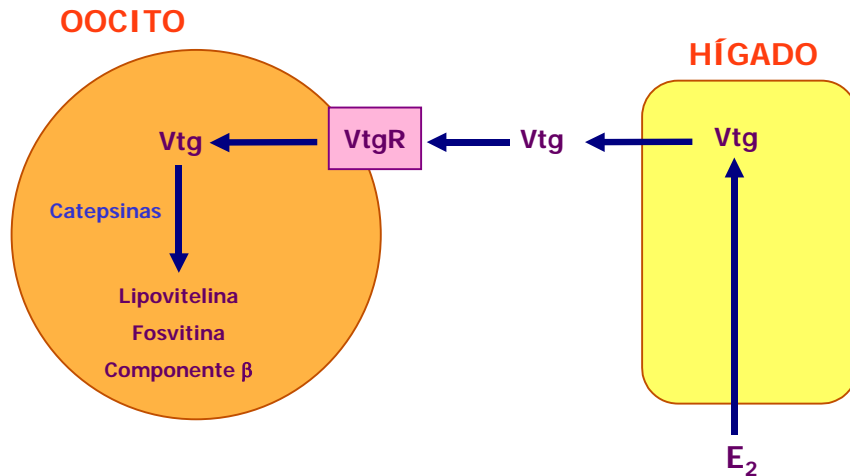


**Fig. 1.2.** Desarrollo ovárico de hembras F1 de lenguado senegalés. Micrografía representativa de secciones histológicas de ovario durante la primavera. Oocitos previtelogénicos en crecimiento primario (1), oocitos en estadio de alvéolos corticales (2), oocitos en vitelogénesis primaria (3), oocitos desarrollando atresia (6). Escala 200  $\mu$ m.

proteína kinasa C, que deriva en la producción de T (Van Der Kraak, 1990, 1991; Van Der Kraak y Chang, 1990). El Adenosín Monofosfato cíclico (AMPC) también actúa como mensajero secundario activando la transcripción de genes implicados en la esteroidogénesis a través del sistema formado por la proteína StAR (“steroidogenic acute protein”) y el citocromo P450 (revisado en Strauss et al., 1999 y Stocco, 2000). Estudios in vitro usando inhibidores de la síntesis de esteroides sugieren que FSH estimula el paso de colesterol a pregnolona, resultando al final de la ruta enzimática la T, que es

transformada a E<sub>2</sub> por la enzima aromatasas presente en las células de la granulosa. Cierta número de especies piscícolas muestran un incremento de la actividad aromatasas en las células de la granulosa durante la vitelogénesis, alcanzando un pico en la vitelogénesis tardía, para disminuir rápidamente en el periodo postvitelogénico anterior a la maduración (Kagawa et al., 1983). Nagahama et al. (1991) demostraron un incremento de la actividad aromatasas en folículos vitelogénicos de medaka vía AMPc-ciclasa al incubarlos con gonadotropinas, y además esta inducción fue inhibida con actinomicina D y cicloheximida, sugiriendo una dependencia tanto transcripcional como traduccional de la acción gonadotropa. Sin embargo, este modelo propuesto en salmónidos, parece no ser válido en otras especies de no salmónidos, como *Fundulus heteroclitus* (Petrino et al., 1989) o *Oryzias latipes* (Onitake e Iwatsu, 1986), donde en la capa de la teca no es posible distinguir células esteroideogénicas, y todo el proceso de producción de esteroides sexuales es atribuido a las células de la granulosa.

El E<sub>2</sub> producido en la granulosa viaja por el sistema vascular hasta el sistema hepático, donde estimula la producción de Vtg. Diversos estudios muestran que la administración exógena de E<sub>2</sub> al corriente sanguíneo es capaz de estimular la producción de Vtg incluso en machos, ya que estos poseen el (los) gen(es) correspondiente(s). La Vtg puede ser purificada a partir de plasma de machos inducidos con 1-10 mg/kg de E<sub>2</sub>, suministrado disuelto en salino (Mañanos et al., 1994b; Mourot y Le Bail, 1995; Silversand et al., 1993; Yao y Crim, 1996), en aceite de maíz (Norberg, 1995), aceite de cacahuete (Hylland y Haux, 1997; Kishida y Specker, 1993), polipropileno glicol (Hara et al., 1993; Inaba et al., 1997) o aceite de coco (Roubal et al., 1997; Scott et al., 2006; Capítulo 3). Los niveles plasmáticos de Vtg suelen estar correlacionados de manera positiva con los niveles plasmáticos de E<sub>2</sub> (Capí-



**Fig. 1.3.** Proceso general de la vitelogénesis. El  $E_2$  plasmático producido por las células somáticas de la granulosa es internalizado en el hígado y capaz de estimular la síntesis de Vtg, que sale al corriente sanguíneo para ser internalizada en el oocito mediante endocitosis específica por el VtgR. Una vez en el interior, es proteolíticamente procesada por las enzimas catepsinas en proteínas más pequeñas.

tulo 3.). La Vtg circulante es selectivamente captada por los oocitos en desarrollo mediante endocitosis acoplada a receptor específico (Wallace, 1985; Kanungo et al., 1990; Tyler et al., 1990; Tyler, 1991). El receptor de Vtg (VtgR) ha sido aislado y caracterizado en diferentes especies ovíparas de vertebrados e invertebrados (Stifani et al., 1990; Chan et al., 1991; Bujo et al., 1994 y 1995; Okabayashi et al., 1996; Tao et al., 1996; Davail et al., 1998; Prat et al., 1998; Schonbaum et al., 2000; Li et al., 2003; Hiramatsu et al., 2004). Más información sobre dicho receptor puede encontrarse en el Capítulo 2.

Una vez internalizada la Vtg en el interior del oocito, es proteolíticamente procesada en péptidos más pequeños, la lipovitelina, la fosvitina y el componente  $\beta$ , los cuales forman el vitelo para el futuro desarrollo del embrión (Fig. 1.3.). El vitelo es almacenado en pequeños gránulos que ocu-

pan todo el citoplasma del oocito lo que produce el típico aspecto rosado del oocito en preparaciones histológicas teñidas con eosina/hematoxilina .

#### 1.1.2.4. Maduración y ovulación de los oocitos

Cuando el oocito llega a su máximo estado de crecimiento al final de la vitelogénesis, está preparado para la fase de maduración. Esta fase viene acompañada de diferentes cambios en el núcleo y el citoplasma del oocito. Durante todo el proceso de vitelogénesis los oocitos han estado detenidos en la profase de la meiosis I, y durante la maduración, ésta se resume hasta la metafase de la meiosis II. La meiosis finalizará en el momento de la fertilización. Durante la maduración del oocito, también llamada maduración meiótica, el núcleo del oocito (vesícula germinal, VG) comienza una migración desde una posición central del oocito hasta su periferia en el polo animal donde se sitúa el micropilo. En esta migración hay evidencias que demuestran un importante papel del citoesqueleto (Habibi y Lessman, 1986). Estudios de microscopía confocal de inmunofluorescencia usando anticuerpos de anti-tubulina, revelan que los microtúbulos se distribuyen en zonas libres de vitelo durante el proceso de crecimiento de los oocitos, formando una red de túbulos de distribución muy organizada, y la misma distribución se ha observado en el proceso de maduración inducida por hormonas (Nagahama et al., 1995). Una vez completada la migración hacia el polo animal, la membrana de la VG se rompe y el nucleoplasma no puede ser distinguido del citoplasma. Los cromosomas se condensan y se alinean, se forma el huso acromático y la extrusión del primer corpúsculo polar: la meiosis I ha sido completada.

El proceso de maduración del oocito es activado por la gonadotropina LH a través de receptores de membrana específicos ligados a la adenilato

ciclasa en las células somáticas de la teca, o de la granulosa dependiendo de las especies, lo cual aumenta los niveles de AMPc e inicia la señal para que estas células sintetizen el esteroide inductor de la maduración (MIS). En salmónidos, ciprínidos y espáridos, se han detectado dos MIS diferentes: 17,20 $\beta$ P (Nagahama y Adachi, 1985; Nagahama, 1987a) y 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ , 21-trihidroxi-4-pregnen-3-one (20 $\beta$ S; Thomas y Prant, 1989). En *S. solea* parece que 17,20 $\beta$ P es el candidato más probable a MIS (Canario, 1991), aunque no se puede excluir la posibilidad de que otros progestágenos puedan actuar como MIS en otras especies de peces planos (Canario y Scott, 1989ab; 1990abc). El MIS actúa sobre el oocito a través de un receptor de membrana que activa al factor promotor de la maduración en el citoplasma del oocito, responsable de la estimulación de la meiosis (Nagahama et al., 1995; Cerdà, 2001).

En algunas especies de teleósteos, el oocito experimenta un gran aumento de tamaño debido a la hidratación. Este aumento del volumen del oocito puede variar desde un ligero aumento en especies de agua dulce y eurihalinas (Hirose, 1976; Iwamatsu y Katoh, 1978; Wallace y Selman, 1978, 1979; Craik y Harvey, 1984, 1986; Selman et al., 1993), hasta un aumento muy considerable en especies marinas (Oshiro y Hibiya, 1981; Wallace y Selman, 1981; Watanabe y Kuo, 1986; Adachi et al., 1988; LaFleur y Tomas, 1991; Wallace et al., 1993). El mecanismo de la hidratación del oocito favorece que los huevos de especies marinas sean flotantes en agua de mar, y según su flotabilidad estos pueden clasificarse como huevos demersales (poco o no flotantes) o huevos pelágicos (flotantes). Se considera que en los huevos demersales la principal fuerza osmótica para la entrada de agua es el incremento de la concentración de iones orgánicos, como el K<sup>+</sup> o el Na<sup>+</sup>, mientras que en los huevos pelágicos, la presión osmótica sería producida

por el aumento en aminoácidos libres y pequeños péptidos producidos en el oocito como consecuencia de la proteólisis del vitelo (Fabra et al., 2006).

Al final del Capítulo, se puede observar la Figura suplementaria 1.1. (Fig. S, 1.1) con un pequeño resumen general del proceso de crecimiento primario, maduración y ovulación.

#### 1.1.2.5. La atresia folicular

La atresia folicular es un fenómeno involutivo que ocurre de manera normal en los ovarios de todos los vertebrados, incluidos los peces, tanto en condiciones naturales como en cautividad (Saidapur, 1978). La atresia puede observarse en todos los estadios del ciclo reproductivo (Miranda et al., 1999), aunque lo más común es observarla durante el periodo de post-puesta (Guraya, 1994). En cautividad, es muy frecuente que ocurra en oocitos vitelogénicos, aunque también se puede observar en oocitos previtelogénicos (Miranda et al., 1999). En teleósteos, puede ser inducida por diferentes factores como stress, agentes biocidas, confinamiento, cambios de luz o temperatura, inanición o niveles hormonales inadecuados (Nagahama, 1983).

Muchas especies de peces en cautividad varían sus ciclos gonadales, completando la vitelogénesis pero no siendo capaces de ovular sin ayuda hormonal externa (Mylonas et al., 1997). Además, se ha encontrado atresia en aquellas hembras incapaces de realizar la puesta tras la inducción hormonal, y se piensa que es precisamente este proceso degenerativo el que puede explicar la ineficacia de estos métodos (Mylonas et al., 1997). Por lo tanto, los estudios de atresia en peces sometidos a confinamiento y a condiciones no naturales son de vital importancia a nivel económico, ya que este proceso degenerativo afecta las tasas de fertilidad (Lam, 1983; Fenerich et al., 1984).



El primer signo de la atresia a nivel microscópico, es una desintegración del núcleo del oocito, seguido de una fragmentación de la zona pellúcida y una hipertrofia de las células foliculares, tal y como han descrito Lowerre-Barbieri et al. (1996) y Mylonas et al. (1997). A nivel citoplasmático, se produce la desintegración de los orgánulos celulares, y las células somáticas comienzan un proceso de ingesta y digestión del vitelo, indicando una activa participación de estas células en el proceso de atresia (Lang, 1981; Besseau y Faliex, 1994). Este proceso fagocítico desarrollado por las células somáticas de la teca y la granulosa hipertrofiadas, ha sido descrito en estudios histológicos (Lambert, 1970). Según Chieffi-Baccari et al. (1992), las células somáticas no sólo digieren el vitelo, sino también otros componentes oocitarios como mitocondrias y otros orgánulos. Shrivastava (1969) sugiere que las células somáticas también son capaces de secretar enzimas para digerir el vitelo. Hay autores que sugieren asimismo la existencia de procesos de apoptosis o muerte celular relacionados con el proceso de atresia (Jans y Van Der Kraak, 1997). En la Tabla 1.1. se muestran los cambios morfológicos descritos por Miranda et al. (1999) en dos especies con diferente estrategia reproductiva en condiciones naturales: *Astyanax bimaculatus lacustris*, la cual tiene un largo periodo reproductivo caracterizado por una puesta parcial, y *Leporinus reinhardti*, la cual tiene un periodo reproductivo muy corto caracterizado por una puesta total. En cautividad *A. bimaculatus lacustris* tiene puestas espontáneas, mientras que *L. reinhardti*, incluso en estadios de avanzada maduración, es incapaz de emitir la puesta sin ayuda hormonal. Ambas especies, a pesar de sus diferentes estrategias reproductivas, muestran similitudes tanto a nivel histológico como ultraestructural en sus procesos de degeneración y reabsorción.

**Tabla 1.1.** Características morfológicas de los folículos ováricos de *A. bimaculatus lacustris* y *L. reinhardti* durante el periodo de atresia folicular.

---

Características morfológicas	
Atresia inicial	Ruptura de la envoltura nuclear y dispersión de la cromatina en el ooplasma Comienzan a desintegrarse los orgánulos en la periferia del citoplasma: mitocondrias, alvéolos corticales y gránulos de yolk. Lagrimas en la zona pellúcida Células somáticas hipertrofiadas. Membrana basal y teca normales.
Atresia intermedia	Licuefacción de los gránulos de yolk. Desintegración y fragmentación de la zona pellúcida. Células somáticas presentan fagocitosis del yolk. La teca comienza a mostrar vascularización.
Atresia avanzada	Yolk prácticamente fagocitado por las células somáticas. Numerosas figuras de mielina en el citoplasma de las células somáticas. Teca muy vascularizada. Membrana basal estrechada.
Atresia final	Yolk completamente reabsorbido. Reducción en el número de células somáticas. Acumulación de gránulos de pigmentos amarillo-marrones (gránulos de lipofucsina). Tejido conectivo muy vascularizado alrededor de las células somáticas. Membrana basal fragmentada. Granulocitos cercanos a los folículos atrésicos.

---

En cautividad, el proceso de atresia puede durar entre 2 y 7 meses dependiendo de la especie y de su estrategia reproductiva, siendo más corto el periodo en peces de puesta total, que en peces de puesta parcial (Miranda et al., 1999). En todos los casos, las hembras con ambos tipos de estrategias son capaces de responder a nuevas inducciones hormonales. Aunque se considera que la atresia es un proceso que reduce el potencial reproductivo, ya que aparece cuando los índices gonadosomáticos (IGS) son más altos (Kjesbu et al., 1991; Palmer et al., 1995), existen autores que consideran que la

atresia no es la causa principal de la reducción de la fecundidad (De Vla-  
ming, 1983).

### 1.1.3. La reproducción en machos

#### 1.1.3.1. Estructura del testículo

En la mayoría de teleósteos, los testículos son un par de lóbulos elongados separados por un septo o independientes entre ellos, unidos a la pared dorsal del cuerpo, aunque en algunas especies (p.e. poecílidos) están combinados en un único saco. Un vaso deferente sale de la superficie meso-dorsal de cada testículo, para alcanzar la papilla urogenital situada entre el recto y el conducto urinario. Dentro del testículo, hay dos compartimentos: el germinal y el intersticial, separados entre ellos por una membrana basal (Lo Nostro et al., 2003). En el compartimento germinal, las células de Sertoli (Sc) envuelven con sus extensiones citoplasmáticas un clon de células germinales en el mismo estadio de desarrollo, formando un espermatocisto (Pudney, 1995). La estructura testicular en teleósteos varía mucho entre especies, pero en general se pueden establecer dos tipos según la organización del tejido germinal: en teleósteos inferiores, el compartimento germinal está organizado en túbulos anastomosados, mientras que en teleósteos superiores están organizados en lóbulos ramificados (Grier, 1993).

El tipo lobular es el más común entre la mayoría de teleósteos y se compone de numerosos lóbulos separados entre ellos por una fina capa de tejido conectivo fibroso. Dentro de los lóbulos, las espermatogonias (Sg) primarias se dividen por mitosis para formar cistos formados por varias Sg secundarias. Durante la maduración, todas las células germinales del cisto se encuentran aproximadamente en el mismo estadio de desarrollo, y tal y como la espermatogénesis y la espermiogénesis avanzan, los cistos se expan-

den y se rompen liberando su contenido a una cavidad central, o lumen, que continúa con el conducto espermático.

El tipo tubular está restringido al grupo de los atheriniformes, como el guppy, *Poecilia reticulata*. Consiste en túbulos orientados entre la túnica externa (final ciego) y la cavidad central, a la cual son liberados los espermatozoides. Las Sg primarias sólo se encuentran en el final ciego, y al avanzar la espermatogénesis y la espermiogénesis, el cisto se desplaza centralmente dentro del testículo hacia el vaso deferente, no existiendo lumen en este tipo (Billard et al., 1982).

Ambos tipos de testículo se pueden asimismo dividir en: no restringido y restringido. En el testículo no restringido, las Sg se pueden encontrar a lo largo del túbulo o lóbulo, mientras que en el restringido, estas células sólo se pueden encontrar en su parte distal (Selman y Wallace, 1986; Grier 1993; Weltzien et al., 2004). El compartimento germinal está envuelto y estructuralmente soportado por el compartimento intersticial, constituido por tejido conectivo, donde podemos encontrar células mioides, fibroblastos, fibras de colágeno, vasos sanguíneos y células de Leydig (Lc).

Durante la espermatogénesis, las células germinales masculinas pasan por tres fases diferentes (Schulz y Miura, 2002; Weltzien et al., 2004): proliferación mitótica (las Sg de tipo A, SgA, se dividen por mitosis para formar Sg de tipo B, SgB, y éstas a su vez para formar espermatocitos, Spc), meiosis (Spc a espermátidas, Spd), y espermiogénesis (de Spd a espermatozoides, Spz). Según cómo se desarrolla la espermatogénesis, Mattei et al. (1993) distinguió dos tipos en teleósteos: espermatogénesis cística o espermatogénesis semi-cística. En el tipo cístico, la espermatogénesis es completada dentro del espermatocisto, el cual se rompe al final de la espermatogénesis para liberar los Spz dentro del lumen lobular o tubular. En el tipo semi-

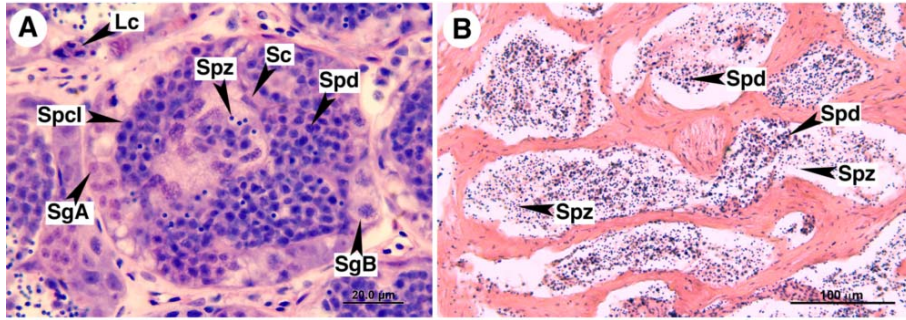
cístico, el cisto se rompe antes de ser completada la espermatogénesis, y ésta es finalizada en el interior del lumen.

El testículo del lenguado senegalés ha sido estudiado recientemente a nivel anatómico, histológico, histoquímico y histoenzimático en los trabajos de García-López et al. (2005, 2006b). A diferencia de la mayoría de teleósteos (p.e. el lenguado inglés, *Parophrys vetulus*, Girard (Sol et al., 1998) y el fletan, *Hippoglossus hippoglossus*, L. (Weltzien et al., 2002), los cuales poseen testículos elongados, *S. senegalensis* posee testículos con forma reniforme en secciones transversales, con dos regiones principales, la cortical y la medular. Los testículos del lenguado común, *S. solea*, parecen tener una forma similar a los de *S. senegalensis* (Baynes et al., 1994; Bromley, 2003), siendo una posible característica de género. Al igual que el lenguado común, el lenguado senegalés también tiene un tamaño testicular y un IGS muy pequeños a lo largo de todo el año, mientras que otras especies de teleósteos presentan grandes variaciones a lo largo de la espermatogénesis. En estas especies el testículo acumula gran cantidad de esperma, característica que no es observada ni en el lenguado común (Baynes et al., 1994; Bromley, 2003) ni en el senegalés (Capítulos 4 y 5). Por el contrario, la estructura interna del testículo del lenguado es muy parecida a muchos teleósteos descritos anteriormente, con una estructura típicamente lobular, y un tipo de espermatogénesis semicística donde las Spd son liberadas del espermatocisto para diferenciarse en Spz en el interior del lumen (García-López et al., 2005). En cuanto a la distribución de las Sg, el lenguado senegalés presenta un modelo intermedio entre el tipo restringido y el no restringido, pues la mayoría de las SgA se encuentran en la parte distal de los lóbulos (García-López et al., 2005).

1.1.3.2. Espermatogénesis, espermiogénesis y espermiación

Tanto en testículos de tipo lobular como tubular, el desarrollo de las células germinales tiene lugar dentro de compartimentos germinales, formados a partir Sc, capaces de englobar varias células germinales dentro de sus extensiones, formando así espermatocistos. Las Sg entonces comienzan a transformarse en Spc. La primera división meiótica produce dos células hijas, los Spc secundarios, SpcII, y la segunda división meiótica da lugar a las Spd. Éstas, aunque ya son haploides, todavía no son capaces de fecundar, necesitan una transformación a Spz, proceso denominado espermiogénesis. En *S. senegalensis*, las Sc sólo engloban Sg y Spc, porque en un determinado momento al final de la meiosis, los espermatocistos se abren y las Spd son liberadas al lumen del lóbulo seminífero, donde se diferenciarán en Spz (García-López et al., 2005). Los espermatocistos (que contienen Sg y/o Spc) se distribuyen a lo largo del lóbulo, aunque la mayor parte de los que contienen Sg de tipo A se encuentran en la parte distal del lóbulo.

Existen dos tipos de Sg descritas en teleósteos: de tipo A (SgA) y de tipo B (SgB). Las SgA son grandes células ( $8,44 \pm 0,48 \mu\text{m}$  de diámetro), ligeramente basófilas, con un gran núcleo y un único, central y basófilo nucleolo. Se encuentran normalmente rodeadas de Sc. Por diferentes mitosis, las SgA dan lugar a las SgB, un poco más pequeñas ( $5,86 \pm 0,21 \mu\text{m}$  de diámetro), con varios nucleolos muy basófilos en posición central. Las SgB, de nuevo se dividen dando lugar a los Spc primarios (SpcI), todos ellos unidos citoplasmáticamente por puentes intercelulares. Estos miden  $5,65 \pm 0,11 \mu\text{m}$  de diámetro y su núcleo tiene una textura granular o irregular debido a la distribución del material genético. Es muy infrecuente observar Spc secundarios (SpcII), ya que su vida es muy corta, y pasan rápidamente a Spd. Su diámetro es de  $3,46 \pm 0,09 \mu\text{m}$  y su núcleo es esférico. Las Spd ya son libera-



**Fig. 1.4.** Fotomicrografías de secciones histológicas transversales de testículo de lenguado senegalés teñidas con eosina/hematoxilina. **(A)** Sección del área cortical de testículo mostrando un lóbulo seminífero conteniendo espermatogonias de tipo A (SgA), espermatogonias de tipo B (SgB), espermatocitos de tipo I (Spcl), espermatidas (Spd), y espermatozoides (Spz). Las células de Sertoli (Sc) y las de Leydig (Lc) adyacentes a los lóbulos también están indicadas. **(B)** Sección del área medular de testículo donde se pueden observar túbulos eferentes llenos de Spz y Spd.

das de los espermatocitos al lumen lobular, miden  $2,31 \pm 0,05 \mu\text{m}$  de diámetro y su citoplasma ya es muy reducido. Éstas comienzan a diferenciarse en Spz; proceso denominado espermiogénesis donde el núcleo y el citoplasma se reorganizan, formando una cabeza ( $1,04 \pm 0,04 \mu\text{m}$  de diámetro), un cuello y un flagelo o cola. A diferencia de otros vertebrados, los Spz de teleosteos carecen de acrosoma, ya que no necesitan digerir la zona pellúcida, sino que se introducen en el huevo directamente por una abertura en éste, el micropilo, por la cual penetra un único espermatozoide (Hart, 1990). Diámetros tomados de García-López et al., 2005.

Las Sc poseen un núcleo con forma triangular en preparaciones histológicas, ligeramente basófilo, y se encuentran situadas en contacto con la membrana basal que separa el compartimento germinal del intersticial. Éstas células proporcionan soporte físico y factores necesarios para la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células germinales. También se



encargan de la fagocitosis de células dañadas. Los túbulos o lóbulos germinales individuales se encuentran separados entre ellos por tejido conectivo, que contiene fibroblastos, vasos sanguíneos y Lc, las cuales a través de su producción de esteroides se piensa que regulan el proceso de espermatogénesis, así como el desarrollo de caracteres secundarios y comportamiento sexual. En la Fig. 1.4., se pueden observar los tipos celulares descritos.

La espermiación en teleosteos implica una maduración o capacitación del espermatozoide, acompañada de una producción de fluido o hidratación del conducto eferente, proceso que es aparentemente dependiente de LH (Billard et al., 1982). Se piensa que la hidratación, por incremento de la presión lóbular, permite al espermatozoide migrar al vaso deferente donde es almacenado hasta su expulsión al exterior (Billard et al., 1982).

#### 1.1.3.3. Regulación endocrina de la espermatogénesis

Durante la espermatogénesis se desarrollan tres grandes procesos: primero, la proliferación mitótica de las SgA, que en teleosteos puede ser inducida por hCG (Miura et al., 1991a), 11-ketotestosterona (11-KT; Miura et al., 1991b; Nader et al., 1999), el factor de crecimiento I similar a la insulina (“insulin like growth factor”, IGF-I; Loir y Le Gac, 1994; Nader et al., 1999), y posiblemente también por GnRH (Minucci et al., 1986). La meiosis y la espermiogénesis parecen estar también inducidas por hCG y 11-KT (Miura et al., 1991ab), en cambio, la espermiación es dependiente del MIS (Ueda et al., 1985; Nagahama, 1994). Al igual que en hembras, los progestágenos 17,20 $\beta$ P y 20 $\beta$ S parecen ser los principales MIS (Nagahama et al., 1983; Ueda et al., 1983; Trant et al., 1986).

En peces planos, 17,20 $\beta$ P parece ser el MIS en la limanda (*Limanda limanda*; Canario y Scott, 1990a), la platija del Norte (*Pleuronectes platessa*,

Canario y Scott, 1990a; Vermeirssen et al., 1998), el lenguado común (*Solea solea*; Scott y Canario, 1992), y el fletan (*Hippoglossus hippoglossus*, Vermeirssen et al., 2000). García-López et al. (2006a) sugiere que 17,20 $\beta$ P podría ser el MIS en *S. senegalensis*. En cambio, este esteroide no ha sido encontrado ni en la platija americana (*Pleuronectes americanus*, Truscot et al., 1992) ni en el lenguado inglés (*Pleuronectes vetulus*, Sol et al., 1998). En rodaballo, *Scophthalmus maximus* L., el 20 $\beta$ S es producido por testículos *in vitro* (Mugnier et al., 1997), siendo éste esteroide también el más eficiente para inducir la maduración final (Mugnier et al., 1997).

La FSH y los andrógenos, principalmente la 11-KT, parecen ser los reguladores de la espermatogénesis. La FSH es esencial para la proliferación de las Sc y la producción de factores del crecimiento (Lejeune et al., 1996). Los andrógenos son producidos en las Lc, las cuales son las principales células esteroidogénicas como respuesta a la estimulación de LH. Además, diversos factores paracrinós y autocrinós activados por las propias gonadotropinas (Pescovitz et al., 1994; Miura et al., 1997; Schlatt et al., 1997) actúan como reguladores generales de todo el proceso.

En teleósteos, los receptores de FSH y andrógenos se expresan en las Sc, mientras que los receptores de LH se expresan en las Lc (Miwa et al., 1994; Oba et al., 2001). Los receptores de FSH parecen ser capaces de interactuar también con LH, mientras que los receptores de ésta última son específicos (Yan et al., 1992; Miwa et al., 1994). 11-KT estimula la producción de activina, la cual induce a las células germinales a iniciar la mitosis, probablemente actuando directamente sobre la célula germinal (Miura et al., 1995; Nagahama et al., 1997; Nagahama, 2000). Esta inducción por activina parece no actuar en estadios posteriores de la espermatogénesis, concretamente a partir de la meiosis (Miura et al., 1997). Sin embargo, los mecanis-

mos de la regulación de la espermatogénesis no se pueden generalizar en peces, ya que en la trucha arco iris por ejemplo, 11-KT parece no tener ningún estímulo sobre la espermatogénesis (Loir, 1999). El efecto esteroidogénico de LH se basa en el incremento del transporte de colesterol al interior de las mitocondrias en las Lc, proceso facilitado por la proteína StAR (Stocco y Clark, 1996).

Una vez en el interior de las mitocondrias, el colesterol se transforma en pregnolona, precursora del resto de hormonas esteroides en vertebrados. 11-KT es el andrógeno más importante en el testículo de teleosteos (Scott et al., 1980; Borg, 1994), incluyendo los pleuronectiformes: fletan (*Hippoglossus hippoglossus*, Methven et al., 1992; Norberg et al., 2001; Weltzien et al., 2002), *Hippoglossus stenolepsis* (Liu et al., 1991), la platija del Norte (*Pleuronectes platessa*, Vermeirssen et al., 1998), el lenguado inglés (*Pleuronectes vetulus*, Sol et al., 1998) y la platija americana (*Pleuronectes americanus*, Campbell et al., 1976; Harming et al., 1995), aunque no se puede despreciar otros andrógenos encontrados en concentraciones más bajas, como la T (Borg, 1994).

En cuanto al perfil plasmático de esteroides sexuales en machos, se pueden distinguir tres fases:

- Fase inicial con niveles plasmáticos bajos de T y 11-KT: corresponde a la proliferación de las Sg y el inicio de la meiosis marcada por la formación de SpcI y II.
- Fase intermedia con incremento de las concentraciones plasmáticas de T y 11-KT: células haploides (Spd y Spz) presentes en los testículos.
- Fase final con bajos niveles plasmáticos de T y 11-KT: los testículos comienzan a entrar en fase de regresión, con las Sc en fase fagocítica activa.

Este patrón estacional se ha observado en *S. senegalensis* (García-López et al., 2006ab) donde en verano se detectan niveles bajos de T y 11-KT, para aumentar en el otoño y alcanzar un pico justo antes del momento de la época de puesta en primavera, cuando el número de machos espermiantes es máximo. Durante el periodo de puesta, los andrógenos vuelven a disminuir alcanzando progresivamente niveles bajos en verano. Se han descrito patrones similares en la platija moteada (*Verasper variegatus*, Koya et al., 2003) y en la gallineta negra (*Sebastes schlegeli*, Mori et al., 2003). En salmonidos, los testículos pasan de sintetizar esteroides C<sub>19</sub> (como T y 11-KT) a esteroides C<sub>21</sub> (como 17,20βP) durante el periodo de puesta (Ueda et al., 1983), patrón que también podría seguir el lenguado senegalés (García-López et al., 2006a).

Al final del Capítulo, se incluye un resumen del proceso de espermatogénesis y espermiogénesis en teleósteos (Fig. S, 1.2).

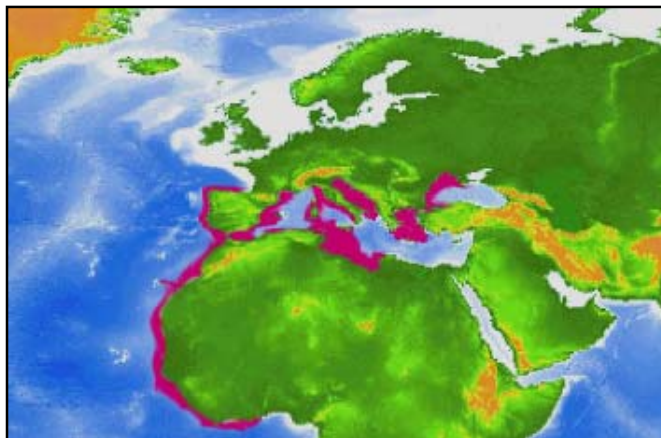
## **1.2. La Acuicultura en España**

La acuicultura en España comenzó en los años 70, en pequeñas empresas familiares las cuales trabajaban básicamente con mejillón y trucha. Posteriormente, en los noventa, se incorporó el cultivo del rodaballo en el Norte de España y de dorada y lubina en el sur, levante y Canarias, incorporando nuevas tecnologías a nivel industrial, científico y empresarial que mejoraron el cultivo piscícola de cada especie en los diferentes niveles biológicos: reproducción, crecimiento larvario, destete y engorde, así como se profundizó en conocimientos de patología y biología del medio. Más tarde aparecieron nuevas especies en la acuicultura española, como la anguila (Levan-

te), el atún rojo (Murcia), la carpa (Baleares), la tenca (Extremadura), el esturión (Cuenca del Guadalquivir), el cangrejo (marismas), o la corvina (Levante). Según la Junta Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR, [http://www.mapa.es/es/pesca/pags/jacumar/presentacion/acuicultura\\_es.htm](http://www.mapa.es/es/pesca/pags/jacumar/presentacion/acuicultura_es.htm)) la producción española de acuicultura continental y marina en el año 2005, supuso el 3% de la producción mundial y el 25% de la europea. Actualmente España se encuentra en el puesto 11º del ranking mundial de productores (datos aportados por el Fondo de Regulación y Organización del Mercado de los Productos de la Pesca y Cultivos Marinos, FROM, adscrito al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, <http://from.mapa.es/>) siendo las especies estrella la lubina, la dorada, el rodaballo y los túnidos.

### **1.3. El lenguado senegalés**

El cultivo de peces planos en Europa comenzó en Gran Bretaña con el lenguado común (*Solea solea*, Linneo 1758) y el rodaballo (*Hipoglossus hipoglossus*), aunque con unas bases biológicas poco claras. Si bien estos países fueron los pioneros, posteriormente en otros países, especialmente Portugal, España, Grecia, Alemania y Noruega, se iniciaron también en su cultivo. Desde los últimos treinta años, el lenguado (*S. solea* y *Solea senegalensis*, Kaup 1858) aparece en el sur de Europa como un buen candidato para la diversificación de los mercados europeos, saturados a causa de la superproducción de dorada y lubina que provoca una reducción en los precios de mercado. Una vez superados los problemas iniciales, el lenguado ha demostrado ser una prometedora especie para la acuicultura marina (Howell, 1997). Uno de los principales problemas con los que se encontró el cultivo



**Fig. 1.5.** Distribución geográfica de *S. senegalensis* (tomado de Porta, 2006)

del lenguado en sus inicios fueron las bajas tasas de crecimiento en juveniles y la aparente gran susceptibilidad a enfermedades, sobretodo pasteurelosis, vibriosis, mixobacteriosis y enfermedades virales. Ambos problemas han sido en parte solventados a lo largo del tiempo mediante la mejora de las dietas y el estudio del stress debido a las grandes densidades de cultivo, aunque sigue siendo necesario y urgente el desarrollo de vacunas y medios profilácticos contra sus patógenos típicos.

Actualmente, los alevines de lenguado muestran un crecimiento y engorde muy optimizado bajo condiciones de cultivo intensivo. Asimismo, esta producción goza de un buen precio de mercado. Sin embargo, el factor limitante en la acuicultura del lenguado sigue siendo la ausencia de métodos para el control de la reproducción en cautividad, lo cual se ha conseguido con éxito en otras especies como la dorada o la lubina. En algunas zonas del sur de España y Portugal se han conseguido puestas viables a partir de reproductores salvajes de lenguado senegalés establecidos durante varios años

en cautividad, aunque estas ocurren de manera espontánea y poco predecible (Dinis et al., 1999; Anguis y Cañavate, 2005). Sin embargo, los tratamientos hormonales para la inducción de la puesta generalmente no funcionan, o producen gametos de baja viabilidad (Dinis et al., 1986, citado en Dinis et al., 1999).

En España, la producción de lenguado se concentra en las comunidades de Andalucía y Cataluña, aunque también se realizan experiencias en instalaciones ubicadas en Galicia y Santander.

### 1.3.1. Taxonomía y distribución geográfica de *S. senegalensis* (Kaup, 1858)

El lenguado senegalés pertenece al Tipo Vertebrata, Subtipo Gnatosomata, Superclase Pisces, Clase Osteichthyes, Orden Heterosomata, Suborden Soleoidei, Familia Soleidae, Subfamilia Soleinae, Género *Solea*, y Especie *senegalensis*. Esta especie se distribuye por todo el Mediterráneo Occidental y por el Atlántico Este desde el Senegal hasta la región de La Rochelle, en Francia (Fig. 1.5.).

Es mencionado como *Solea melanochira* (Borja, 1920) y recupera su identidad como *S. senegalensis* en posteriores trabajos: en la costa Norte de Túnez (Goucha y Ktari, 1981), en el lago de Ichkeul (Chaouachi y Hassine, 1998), en el Golfo de Lyon (Quignard et al., 1986) y en el Mediterráneo (Rodríguez y Rodríguez, 1980), referencias tomadas de CIESM (The Mediterranean Science Commission). Es confundido con *Solea solea*, Linneo 1758 (= *S. vulgaris*), especie más común en aguas del Atlántico Norte, aunque coexiste con *S. senegalensis* en el Atlántico Este y en el Mediterráneo. Ambas guardan un gran parecido. Externamente se diferencian en la membrana interrredial de la aleta pectoral del lado ocular, de color negro en *S. senega-*

*lensis* en su mitad posterior. Ambas especies son gonocóricas (sexos separados), las hembras maduran a partir del tercer año de vida para *S. Senegalensis*, o en el cuarto para *S. solea* (Dinis et al., 1999), cuando las longitudes son 32 y 27-30 cm, respectivamente (Ramos, 1982). Incluso las larvas de ambos son planctónicas y muy difíciles de distinguir. Las tasas de fecundidad también son muy similares, 509 oocitos/ g para *S. senegalensis* y 530 oocitos/ g para *S. solea* (Dinis et al., 1999) aunque las épocas de reproducción no coinciden temporalmente: invierno para *S. solea* (enero-marzo) y primavera para *S. senegalensis* (marzo/abril-junio) (Ramos, 1982; Anguis y Cañavate, 2005).

### 1.3.2. Morfología externa y biología en el medio natural

El lenguado senegalés es un pez plano de cuerpo ovalado y asimétrico con ambos ojos sobre el costado derecho. Hocico redondo y boca pequeña de forma semicircular que alcanza el borde inferior del ojo derecho. Aletas dorsal y anal de base muy amplia claramente separadas de la aleta caudal. Final de las aletas dorsal y anal unidas por una fina membrana en la base de la aleta caudal. La aleta pectoral en el lado ocular y presenta una pigmentación de color negro en la parte media y distal de su membrana. Línea lateral recta formando un pequeño arco en la zona supratemporal. Abundante mucosidad corporal presentando varias tonalidades de pigmentación de marrón muy claro a más oscuro pudiendo presentar pequeñas manchas concéntricas de diferente tonalidad. Los ejemplares adultos suelen medir 30-35 cm en el Mediterráneo y hasta 60 cm en el Atlántico. En la Fig. 1.6. se muestra representado un ejemplar adulto.

El lenguado es una especie marina bentónica, le gusta vivir sobre fondos arenosos y camuflarse en ellos, llegando a una profundidad de hasta





**Fig. 1.6.** Ejemplar adulto hembra de lenguado senegalés durante la época de puesta en la primavera, de aproximadamente 4 años de edad, 45 cm de longitud y 1,8 kg de peso.

100 metros. Se alimenta de organismos invertebrados bentónicos como anélidos, larvas de poliquetos y moluscos bivalvos (Braber y De Groot, 1973) y sobretodo se alimenta por la noche (De Groot, 1971). Se trata de un pez gonocórico, desprovisto de caracteres sexuales secundarios aunque en la época de reproducción las hembras experimentan un aumento considerable de los ovarios, y un cambio de color en la zona ventral visibles a simple vista.

Presenta dos épocas de puesta: la más importante desde marzo hasta junio, y la segunda, de menor importancia, de septiembre/octubre hasta noviembre. Es en los meses de octubre a junio cuando las hembras experimentan un desarrollo mayor de los ovarios, sufriendo una regresión parcial de las gónadas en los meses de verano. Los machos producen esperma durante todo el año, aunque la máxima proporción ocurre en primavera y disminuye en los meses de verano (García-López et al., 2006ab).

La reproducción tiene lugar a temperaturas entre 13 y 23° C, aunque pueden darse altas fecundidades entre 15 y 21° C (Anguis y Cañavate, 2005). Los huevos son pelágicos, miden alrededor de un milímetro, y presentan

numerosos aglomerados de glóbulos lipídicos formando una espiral dentro del huevo. La duración de la incubación en el medio natural suele durar una semana aunque varía con la temperatura (Russel, 1976). Al eclosionar las larvas miden de  $2,4 \pm 0,1$  mm (Dinis et al., 1999), son planctónicas y abundan en los primeros metros de la superficie. Al final de la vida larvaria descienden progresivamente a mayor profundidad comenzando la formación de la típica disimetría (proceso de metamorfosis). Los juveniles se encuentran cerca del litoral y comienzan a llevar una vida béntica, se reagrupan en zonas interdiales durante unos ocho meses y después se alejan de la costa hacia zonas más profundas. Durante este periodo, los juveniles se caracterizan por una elevada tasa de crecimiento. Adquieren la madurez sexual aproximadamente a los tres años y 30-35 cm de longitud (Person Le Ruyet et al., 1989).

#### **1.4. Cultivo en cautividad y control de la reproducción**

##### 1.4.1. Cultivo en cautividad

En el sur de España, la reproducción en cautividad de *S. senegalensis* se viene estudiando desde principios de los 80 sobre ejemplares salvajes obtenidos en los esteros de Cádiz y adaptados a condiciones de cautividad (Rodríguez y Pascual 1982a; Dinis, 1992; Bedoui, 1995). Los individuos son preferiblemente pescados en las épocas de inter-puesta (julio a septiembre), para que las hembras no se estresen y sufran regresión gonadal. Los stocks de reproductores se mantienen a baja densidad ( $\leq 5$  kg/m<sup>2</sup>) bajo semi-oscuridad. La aclimatación de la dieta, desde invertebrados a dieta artificial (pienso), se realiza de forma paulatina, aunque se mantiene un suministro de

poliquetos ad libitum al menos un día por semana durante la época de maduración final (Dinis et al., 1996).

El periodo de puesta suele variar entre 4 y 6 meses, declinando la talla de los huevos a lo largo de dicho periodo (Dinis 1999). Las puestas son tanto mejores cuanto más bajas son las temperaturas durante el invierno (por debajo de 10°C), y durante la época de puesta, éstas parecen ocurrir entre 17 y 20°C (según Dinis (1999), no hay puestas por debajo de 16°C). La producción media de huevos es de 29.600±21.600 huevos día/Kg, y la mayoría de los huevos (65-73%) son producidos a los tres días después de un aumento de 2,5° C de la temperatura. La tasa de fertilización puede ser muy variable (45-63%), mientras que la tasa de eclosión, la cual ocurre aproximadamente a las 42 h desde la fertilización a 19° C, es del 70-57% (Anguis y Cañavate, 2005).

Las larvas eclosionan con una longitud media de 2,4±0,1 mm, con pequeñas variaciones según stock y tamaño del huevo (Dinis, 1986 citado en Dinis et al., 1999). La alimentación de las larvas del lenguado senegalés ha sido ampliamente documentada (Dinis et al., 1999). Inicialmente son alimentadas con rotífero durante los primeros 3 a 9 días tras la eclosión (DTE), seguidos de *Artemia nauplii*, o directamente de *Artemia* desde el primer día. Estas dietas vivas son pobres en ácidos grasos esenciales, según documentó Sargent et al. (1999) por lo cual son enriquecidas con algas, aceites, o otras emulsiones ricas en nutrientes esenciales. La metamorfosis suele comenzar sobre el día 11 DTE, con la migración del ojo, y suele estar completada sobre el día 19 DTE, con una longitud media de 7,3±0,8 mm (Dinis et al., 1999). El momento del destete, o aclimatación a piensos comerciales de pequeño tamaño, varía entre autores, a partir del día 31 DTE (Dinis et al., 1992); a partir del día 43 DTE (Cañavate y Fernandez-Díaz, 1999); o incluso

a partir de los 6 meses (Flos et al., 1995), dependiendo del balance deseado entre coste y supervivencia. Sin embargo, una alimentación inadecuada durante el estado larvario y/o a lo largo de la metamorfosis, provoca graves problemas de mortalidades, malformaciones, malpigmentaciones y patologías (Soares et al., 2001; Padrós et al., 2003; Zarza et al., 2003), y aún hoy en día, este problema es una grave limitación para el cultivo larvario a gran escala.

#### 1.4.2. Inducción a la puesta y control de la reproducción

En el lenguado senegalés todavía no se han desarrollado métodos para el control de la puesta en cautividad, hecho sin embargo esencial para el futuro desarrollo del cultivo de esta especie. Mediante la manipulación del termoperiodo se han conseguido puestas (Anguis y Cañavate, 2005; Álvarez et al., 2003), pero el método no está suficientemente optimizado. La inducción a la puesta en cautividad con análogos del neuropéptido liberador de LH (LHRHa; Guzman et al., 2005) o con hCG (Guzman et al., datos no publicados), no han producido puestas viables, o éstas han sido viables pero no repetibles. Asimismo, el masaje abdominal de las hembras para obtener huevos y posterior fertilización in vitro con esperma tampoco ha sido estudiado, a diferencia de otros peces planos como el rodaballo (Imslund et al., 2003). Estos datos confieren a los protocolos de inducción a la puesta una importancia máxima para el control hormonal de la reproducción en cautividad y para abastecer la necesidad de diversificación del mercado, que no pueden satisfacer los protocolos tradicionales de variación de la temperatura y fotoperiodo.

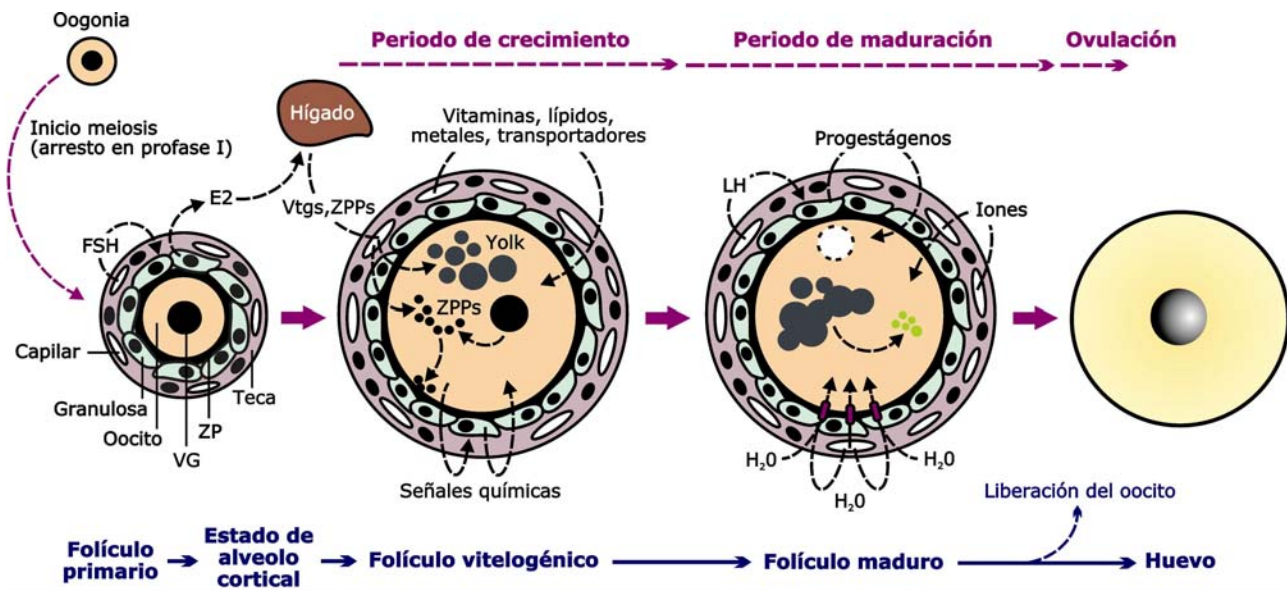
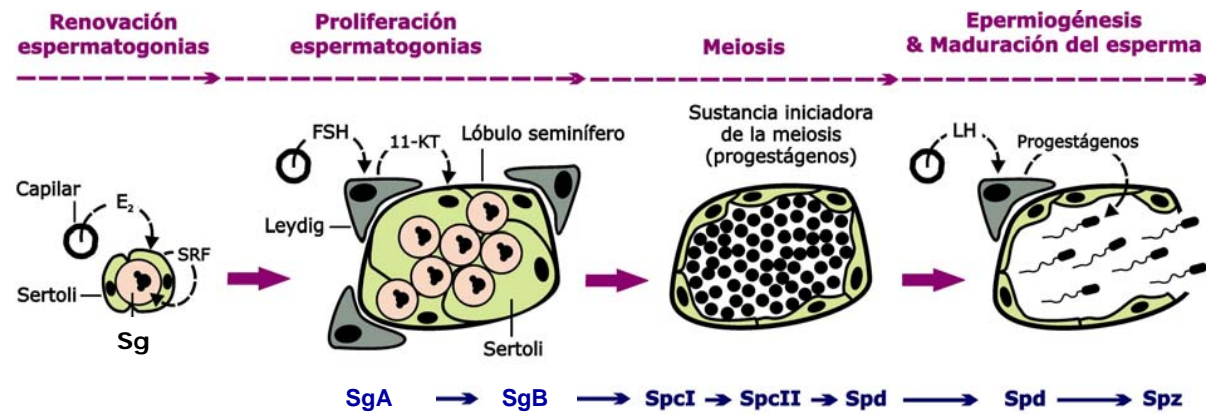


Fig. S, 1.1. Esquema general del proceso de crecimiento ovocitario, maduración y ovulación en teleósteos.



**Fig. S, 1.2.** Esquema general del proceso de espermatogénesis, espermiación y maduración del esperma en teleósteos.



## **Objetivos**





## **OBJETIVOS**

El lenguado senegalés es una nueva especie en la acuicultura mediterránea cuyos mecanismos reproductores son sin embargo todavía muy desconocidos. En el presente estudio se han investigado algunos de los mecanismos moleculares y endocrinos implicados en el crecimiento del oocito (vitelogénesis), maduración y ovulación. Asimismo, se han establecido protocolos para la inducción de la ovulación en hembras y la estimulación de la espermatogénesis en machos en condiciones de cautividad.

Los principales objetivos han sido:

1. Identificar y caracterizar potenciales marcadores moleculares que contribuyan a entender los mecanismos fisiológicos que regulan el balance entre el desarrollo folicular y atresia ovárica.
2. Desarrollar un ELISA para cuantificar los niveles plasmáticos de vitelogenina en el lenguado y así poder estudiar de un modo global el proceso de vitelogénesis en esta especie.
3. Estudiar la eficiencia de diferentes vías de administración de GnRH $\alpha$ , inyección intramuscular o implantes de liberación sostenida, para inducir a la puesta y la espermiación en hembras y machos de lenguado senegalés generación F1, respectivamente.
4. Desarrollar protocolos adicionales para estimular la espermatogénesis y/o la calidad del espermatozoide durante la estimulación de machos de lenguado con GnRH $\alpha$ .



**2.**

**Caracterización molecular del receptor de vitelogenina (VtgR) y de la proteína de unión a ácidos grasos 11 (FABP11) en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)**



## 2.1. Introducción

La atresia, proceso folicular degenerativo y reabsortivo, es un mecanismo fisiológico normal de la morfogénesis de vertebrados. En peces teleósteos, la atresia está relacionada con el crecimiento ovárico normal y la regresión post-ovulatoria, y ocurre de forma elevada en hembras que no ovulan tras la vitelogénesis y/o la maduración del oocito. La presencia de folículos atrésicos también está frecuentemente asociada a estrés medioambiental o a cambios en los niveles hormonales durante la vitelogénesis (Saidapur, 1978; Nagahama, 1983, 1994). Por ejemplo, la atresia ovárica puede ser causada por hipofisectomía (Guraya, 1986; Saidapur, 1978), o por exposición a contaminantes químicos ambientales (Kling, 1981; Van Den Belt et al., 2002). Es bien sabido, que en mamíferos la degeneración ovárica folicular es un proceso apoptótico hormonalmente controlado y un suceso de muerte celular programada (Kaipia y Hsueh, 1997; Morita et al., 1999; Matova y Cooley, 2001; Hussein, 2005). Aunque el proceso de apoptosis ha sido demostrado en ovario de varias especies de teleósteos (Janz y Van Der Kraak, 1997; Wood y Van Der Kraak, 2001), y en presencia de disruptores endocrinos (Janz et al., 1997, Uchida et al., 2004), todavía no se ha estable-

---

**Abreviaturas:** AG, ácidos grasos; apo, apolipoproteína; BI, inferencia Bayesiana; Ct, umbral de ciclo; FABP, proteína de unión a ácidos grasos; IGS, índice gonadosomático; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LDLR, receptor de LDL; LDLR(R8), LDLR relativo con 8 repeticiones de unión a ligando; ML, “maximum likelihood”; NJ, “neighbor-joining”; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; q-PCR, PCR cuantificativa en tiempo real; RT-PCR, PCR de la transcriptasa inversa; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad ; VLDLR, receptor de VLDL; Vtg, vitelogenina; VtgR, receptor de Vtg; VtgR+, variante de VtgR más larga y con dominio de unión a azúcares; VtgR-, variante de VtgR más corta y sin dominio de unión a azúcares.

cido una relación firme entre muerte celular programada y atresia. Además, la proteólisis inducida por proteínas del vitelo podría llevar a la atresia folicular (Wood y Van Der Kraak, 2003). Factores hormonales producidos en las gónadas de peces parecen jugar un papel central en el crecimiento de los folículos ováricos, el mantenimiento del sincronismo ovárico y en el proceso de la atresia folicular (Andreu-Vieyra y Habibi, 2000; Habibi et al. 2001).

En teleósteos, como en otros vertebrados ovíparos, las células germinales femeninas acumulan durante la vitelogénesis las reservas de componentes nutricionales e informacionales necesarios para el posterior desarrollo del embrión (Wallace, 1985; Mommsen y Walsh, 1988; Tyler y Sumpter, 1996; Wiegand, 1996). El crecimiento oocitario ocurre a través de la absorción de las proteínas precursoras del vitelo circulantes en plasma, predominantemente la vitelogenina (Vtg). Esta glicolipofosfoproteína es sintetizada en el hígado bajo control estrogénico, y es incorporada al oocito por endocitosis mediada por receptor específico, el receptor de Vtg (VtgR), y posteriormente es fragmentada y procesada en las proteínas del vitelo. El gen que codifica el VtgR, *vtgr*, pertenece a la superfamilia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR; Jeon y Blacklow, 2005). Estos receptores de membrana parece que han evolucionado en animales ovíparos para mediar el transporte de ligando al interior celular y sustentar el esfuerzo reproductivo realizado por las especies ovíparas (Schneider et al., 1999; Schneider y J. Nimpf, 2003). Las proteínas de unión a ácidos grasos (AG), las FABPs, son pequeñas proteínas citoplasmáticas muy conservadas que se unen a los AG de larga cadena y otros ligandos hidrofóbicos. Se piensa que las FABPs son responsables también de la internalización de los AG, su transporte y metabolismo, aunque podrían también ser responsables de la modulación del crecimiento y de la proliferación celular (Zimmerman y Veerkamp 2002;

Hauerland y Spener, 2004). Se han detectado diferentes tipos de FABPs en ovarios de roedores en diferentes estadios fisiológicos (Watanabe et al., 1991; Iseki et al., 1995; Nourani et al., 2005ab). También se ha demostrado que la expresión de algunos genes codificantes para proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico y lipoproteico, incluyendo FABPs y LDLRs, son los más regulados en el ovario de rata tras la administración de hormona coriónica humana (Leo et al., 2001). Los oocitos previtelogénicos de peces expresan grandes cantidades de los transcritos *vtgr* y *fabp3* (Perazzolo et al., 1999; Liu et al., 2003), y la reabsorción del material lipídico en los folículos atrésicos produce la aparición de proteínas del vitelo asociadas a lipoproteínas plasmáticas de alta densidad (Babin, 1987). Estos datos sugieren la importancia del metabolismo lipídico y de los genes relacionados con el crecimiento y la degeneración folicular durante el desarrollo ovocitario.

El análisis histológico de las gónadas de peces teleósteos se emplea rutinariamente para describir y cuantificar los distintos estadios morfológicos de desarrollo folicular, incluyendo el número de folículos vitelogénicos y atrésicos (Saidapur, 1978; Nagahama, 1983; Blazer, 2002). Sin embargo, actualmente no existen marcadores disponibles para el estudio de los mecanismos moleculares que regulan el balance entre desarrollo folicular y la atresia en teleósteos. En este capítulo, se describe la caracterización molecular de los ADNc de *vtgr*, incluyendo dos variantes transcripcionales, y de un nuevo subtipo de FABP, denominado *fabp11*, en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Los resultados indican que ambos transcritos se expresan en oocitos previtelogénicos, aunque el ARN de *fabp11* aparece muy acumulado en las células somáticas asociadas con oocitos en proceso de atresia. De este modo, se aportan datos que indican la existencia de una correlación



positiva entre la presencia de transcritos de *vtgr* y *fabp11* en el ovario y el porcentaje de folículos en previtelogénesis y atresia, respectivamente.

## 2.2. Material y métodos

### 2.2.1. Animales

Se obtuvieron individuos adultos de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) generación F1, de aproximadamente 2-3 años de edad, producidos a partir de diferentes stocks de individuos salvajes aclimatados a cautividad en las instalaciones del CIFPA “El Toruño” (Puerto de Santa María, Cádiz). Los animales se mantuvieron en el Centro de Acuicultura-IRTA durante aproximadamente un año antes de comenzar los experimentos. Durante el proceso de adaptación, los peces fueron alimentados *ad libitum* una vez al día con pellets comerciales (Proaqua, España) y dos veces por semana con calamares y mejillones frescos, y fueron estabulados bajo condiciones naturales de temperatura y fotoperiodo en tanques rectangulares de 12.000 L. Los animales fueron sexados y marcados.

Durante tres años consecutivos, 3-5 hembras fueron sacrificadas aproximadamente cada mes; correspondiendo a diferentes estadios foliculogénicos; anestesiadas con 500 ppm de 2-fenoxietanol (Acros Organics, USA) y los índices gonadosomáticos (IGS; peso gonadal/peso corporal x 100) fueron registrados. Se recogieron pequeñas piezas de diferentes tejidos en condiciones libres de ribonucleasas, las cuales se procesaron para la posterior extracción de ARN e hibridación in situ. Una pieza de gónada adyacente a estas muestras se fijó en solución de Bouin modificada (75% ácido

pírico, 25% formalina). Durante el primer mes, se sacrificaron cuatro machos y se extrajo una muestra de testículo de cada uno.

### 2.2.2. Análisis histológico

Las piezas de ovario se fijaron con Bouin durante 3-4 horas, se deshidrataron, y fueron incluidas en parafina (Paraplast, Sigma-Aldrich). Se realizaron secciones de 5  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con eosina/hematoxilina. El perfil de la frecuencia de los diferentes estadios de los folículos ováricos se determinó sobre secciones histológicas bajo microscopio óptico. La cantidad de oocitos previtelogénicos, en vitelogénesis temprana, vitelogénicos y atrésicos se expresó en porcentaje ( $n= 100-150$  folículos) en al menos 3 secciones histológicas diferentes por hembra.

### 2.2.3. Aislamiento de los ADNc de *vtgr* y *fabp11* a partir de ovario de *Solea senegalensis*

El ARN total de ovario fue extraído a partir de una hembra vitelogénica de lenguado senegalés usando el RNeasy Maxi Kit (Qiagen, Francia), con el cual se construyó una genoteca de ADNc en el vector Uni-ZAP® XR (Stratagene, Holanda) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El título de la librería resultante fue de  $1,5 \times 10^7$  pfu/ml y el tamaño medio de los insertos de 1.200 pb.

Para clonar la secuencia completa del *vtgr*, membranas de nitrocelulosa (Hybond-N, GE Healthcare, Francia) que contenían aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  pfu por duplicado fueron hibridadas con un fragmento de ADNc de *vtgr* de trucha marcado radioactivamente con  $^{32}\text{P}$ -ATP. Este ADNc (794 pb) se generó tras digerir el ADNc completo de *vtgr* de trucha (*Oncorhynchus mykiss*, GenBank™ No. OMY417877, Davail et al., 1998) con los enzimas de

restricción *SmaI* y *XbaI*, en las posiciones 1063- y 1857-pb respectivamente. El correspondiente fragmento fue analizado por electroforesis en gel de agarosa, purificado por columna (NucleoSpin<sup>®</sup> Extract kit, Macherey-Nagel, Francia) y marcado por “random priming” con  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP (MP Biomedicals Europe, Francia). El ADN marcado se purificó de nuevo empleando las columnas del NonaPrimer Kit (Quantum Appligene, Francia). La sonda radioactiva fue cuantificada en  $1,2 \times 10^5$  cpm/ $\mu$ L. Las membranas fueron pre-hibridadas en 50% formamida, 5x tampón de Dehhardt, 5x SSC (0,75 M NaCl, 0,0075 M Na<sub>3</sub>citrato-2H<sub>2</sub>O), 50 mM sodio fosfato, pH 6,5, con 0,1% SDS y 200  $\mu$ g/ml de ARN de levadura (precalentado 10 min a 96°C) durante 2h a 42°C. Tras desnaturalizar la sonda de trucha marcada con <sup>32</sup>P-ATP (5 min a 95°C), ésta fue añadida a la solución de prehibridación (concentración final  $7,5 \times 10^5$  cpm/ml), incubando toda la noche a 42°C. Al día siguiente se realizaron los baños con 2x SSC+0,1% SDS a temperatura ambiente (2 x 10 min) y a 42°C durante 5 min. Las membranas fueron reveladas por exposición de intensidad lumínica en pantallas de fósforo a -80°C durante 48h. A partir de los clones que mostraron señales fuertes sobre los filmes revelados se realizó un segundo cribado bajo las mismas condiciones. Los clones positivos se aislaron mediante escisión en vivo del fagémido pBluescript SK (-) a partir del vector Uni-ZAP<sup>®</sup> XR usando el sistema ExAssist<sup>®</sup> Helper Phage (Stratagene, Amsterdam, Holanda).

Se identificaron tres clones positivos: uno correspondiente a la secuencia completa de *vtgr* (clon S9A5), otro a una segunda secuencia del *vtgr* no completa (S5A) y un tercer clon quimérico (S8A2) el cual contenía un fragmento de la secuencia de *vtgr* y los 5'-579-pb de una proteína posteriormente denominada FABP11 (incluyendo los 402-pb de la región codificante completa). Los extremos 3' correspondientes a la región no traducida del

ADNc de *fabp11* del clon S8A2 se consiguieron con el cebador específico SHF3-S1 (5'-ACGACAGGAAGACCAAGACCG) y un cebador universal para transcripción reversa (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC (T)<sub>15</sub>). El ADN fue amplificado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando el cebador SHF3-S1 y el cebador 3' RACE (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'), tal y como se indica André et al., 2000, en un volumen final de 50 µl, conteniendo 1µl de ADNc de ovario, 2,5 U de Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, USA), 2,5 mM de dNTPs, 50 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0,6 µM de SHF3-S. Las condiciones de PCR fueron: un ciclo a 94°C durante 3 min; 5 ciclos a 94°C durante 20 seg, 68°C durante 15 seg y 72°C durante 1 min. Un paso de extensión final de 2 min a 72°C en el cual se añadió el cebador 3' RACE (4 ng/µl de concentración final), seguido de 5 ciclos a 94°C durante 20 seg, 70°C durante 15 seg, 72°C durante 1 min; 25 ciclos a 94°C durante 20 seg, 68°C durante 15 seg, 72°C durante 1 min; y una extensión final de 72°C durante 5 min. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa, purificados por columna (NucleoSpin® Extract kit, Macherey-Nagel), subclonados en el sitio *EcoRI* del vector pGEMT-Easy (Promega, Francia) y secuenciados (Eurogentec, Bélgica). Tres clones resultaron contener la misma región 3' de FABP11, incluyendo la cola poli-A.

El análisis de la secuencia de aminoácidos del VtgR deducida a partir del clon S9A5 reveló que esta secuencia carecía del dominio de unión a azúcares, y fue clasificada como isoforma VtgR<sup>-</sup>. El ADNc codificante de este dominio, presente en la isoforma VtgR<sup>+</sup>, fue amplificado con los cebadores específicos S-og-S1 (5'-AGCTCATCCAGCTGTCAG) y S-og-AS1 (5'-TCCACATGAGGAAACCAC), localizados 169 pb arriba y 122 pb abajo, respectivamente, de la zona correspondiente al dominio de unión a azúca-

res. La reacción de PCR se realizó a partir de 1 µl de ADNc de ovario vitelogénico en un volumen final de 100 µl, con 5 U de Taq DNA polymerase (Promega), 0,25 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0,76 µM de cada cebador. La secuencia de la reacción fue: una desnaturalización inicial de 94°C durante 3 min, seguida de 30 ciclos de amplificación de 94°C durante 30 seg, 59°C durante 30 seg, 72°C durante 30 seg y una elongación final de 72°C durante 3 min. Las dos bandas resultantes fueron separadas en gel de agarosa al 2,5% y subclonadas en el sitio *EcoRI* del vector pGEMT-Easy (Promega), y secuenciadas.

#### 2.2.4. Secuencias utilizadas

Las secuencias proteicas deducidas fueron obtenidas de GenBank™/EBI (gb; [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) o UniProt (up; [www.ebi.uniprot.org/index.shtml](http://www.ebi.uniprot.org/index.shtml)), o en algunos casos deducidas a partir de Ensembl *Takifugu rubripes* ([www.ensembl.org/Takifugu\\_rubripes/index.html](http://www.ensembl.org/Takifugu_rubripes/index.html)) o Tetraodon Genome Browser ([www.genoscope.cns.fr/externe/tetranew/](http://www.genoscope.cns.fr/externe/tetranew/)). Los números de acceso (el número en paréntesis tras el número de acceso corresponde al código usado para designar la secuencia) para las FABP de vertebrados fueron: UniProt:P07148 (1) para FABP1, UniProt:P12104 (2) para FABP2, UniProt:P05413 (3) para FABP3, UniProt:P15090 (4) para FABP4, UniProt:Q01469 (5) para FABP5, UniProt:P51161 (6) para FABP6, UniProt:O15540 (7) para FABP7, y UniProt:P02689 (8) para FABP8 de humanos (*Homo sapiens*); UniProt:P12710 (9) para FABP1, UniProt:P55050 (10) para FABP2, UniProt:P11404 (11) para FABP3, UniProt:P15090 (12) para FABP4, UniProt:Q05816 (13) para FABP5, UniProt:P51162 (14) para FABP6, UniProt:P51880 (15) para FABP7, UniProt:P24526 (16) para FABP8, y UniProt:O08716 (17) para FABP9 de ratón (*Mus musculus*); Uni-

Prot:P02693 (18) para FABP2, UniProt:P07483 (19) para FABP3, UniProt:P70623 (20) para FABP4, UniProt:P55053 (21) para FABP5, UniProt:P80020 (22) para FABP6, UniProt:P55051 (23) para FABP7, y UniProt:P55054 (24) para FABP9 de rata (*Rattus norvegicus*); UniProt:P49924 (25) para FABP1, UniProt:Q45KW7 (26) para FABP2, UniProt:O02772 (27) para FABP3, UniProt:O97788 (28) para FABP4, UniProt:Q2EN74 (29) para FABP5, y UniProt:P10289 (30) para FABP6 de cerdo (*Sus scrofa*); UniProt:Q90WA9 (31) para FABP1, UniProt:Q7ZZZ5 (32) para FABP2, UniProt:Q6DRR5 (33) para una proteína denominada aquí FABP3, UniProt:Q90X55 (34) para FABP4, UniProt:Q5ZIR7 (35) para una proteína denominada aquí FABP5, UniProt:Q05423 (36) para una proteína denominada aquí FABP7, GenBank:XP\_418309 (37) para FABP8, y UniProt:P80226 (38) para FABP10 de pollo (*Gallus gallus*); deducida a partir del clon GenBank:CN098757 (39) para una proteína denominada aquí FABP2, y UniProt:Q28CE2 (40) para FABP7 de *Xenopus tropicalis*; UniProt:Q6PGR8 (41) para una proteína denominada aquí FABP3a, UniProt:Q6GPY9 (42) para una proteína denominada aquí FABP3b, UniProt:Q5PPW3 (43) para una proteína denominada aquí FABP7, y UniProt:Q6GPT0 (44), UniProt:Q5FWM7 (45), UniProt:Q66L00 (46), y UniProt:Q6P705 (47) para FABPs no clasificadas de *Xenopus laevis*; GenBank:BC095259 (48) para FABP1a, GenBank:XM\_680590 (49) para FABP1b, UniProt:Q9PRH9 (50) para FABP2, UniProt:Q8UUVG7 (51) para FABP3, GenBank:NP\_001002076 (52) para FABP6, UniProt:Q9I8N9 (53) para FABP7a, UniProt:Q6U1J7 (54) para FABP7b, UniProt:Q9I8L5 (55) para FABP10, UniProt:Q66I80 (56) para una proteína denominada aquí FABP11a, y UniProt:Q503X5 (57) para una proteína denominada aquí FABP11b del pez cebra (*Danio rerio*); UniProt:Q90W92 (58) para FABP3,

UniProt:Q645P9 (59) para una proteína denominada aquí FABP10, y deducida a partir del clon GenBank:CN985071 (60) para una proteína denominada aquí FABP11 de *Fundulus heteroclitus*; deducida a partir del clon GenBank:CA845456 (61) para una proteína denominada aquí FABP2a, ETR:NEWSINFRUT00000154534 (62) para una proteína denominada aquí FABP2b, ETR:NEWSINFRUT00000161229 (63) para una proteína denominada aquí FABP10, y deducida a partir del clon GenBank:CA847283 (64) para una proteína denominada aquí FABP11 del pez fugu (*Takifugu rubripes*); GenBank:AAM22208 (65) para una proteína denominada aquí FABP1 del mero de pintas anaranjadas (*Epinephelus coioides*); deducida a partir del clon GenBank:CK890396 (66) para una proteína denominada aquí FABP1, y UniProt:Q6R758 (67) para una proteína denominada aquí FABP3 de salmón (*Salmo salar*); deducida a partir del clon GenBank:BX866673 (68) para una proteína denominada aquí FABP2, UniProt:O13008 (69) para FABP3, deducida a partir del clon GenBank:CX251727 (70) para una proteína denominada aquí FABP10, deducida del clon GenBank:CA357251 (71) para una proteína denominada aquí FABP11a, y deducida a partir del clon GenBank:CF752694 (72) para una proteína denominada aquí FABP11b de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*); UniProt:Q4S6K4 (73) para una proteína denominada aquí FABP2, UniProt:Q4RMM1 (74) para una proteína denominada aquí FABP7a, UniProt:Q4T8P8 (75) para una proteína denominada aquí FABP7b, TGB:GSTENT00003005001 (76) para una proteína denominada aquí FABP10, y GenBank:CR733066 (77) para una proteína denominada aquí FABP11 del pez globo (*Tetraodon nigroviridis*); deducida a partir del clon GenBank:AM144272 (78) para una proteína denominada aquí FABP3, UniProt:Q2PHF0 (79) para FABP7, deducida a partir del clon GenBank:BJ910672 (80) para una proteína denominada aquí FABP10, y deduci-

da a partir del clon GenBank: BJ875298 (81) para una proteína denominada aquí FABP11 de medaka (*Oryzias latipes*); UniProt:O57668 (82) para FABP3, y UniProt:O57691 (H6-FABP) (83) para una proteína denominada aquí FABP11 del pez hielo (*Cryodraco antarcticus*); UniProt:O57669 (84) para FABP3, y UniProt:O57663 (H6-FABP) (85) para una proteína denominada aquí FABP11 de bacalao antártico (*Notothenia coriiceps*); UniProt:O57670 (86) para FABP3, y UniProt:O57665 (H6-FABP) (87) para una proteína denominada aquí FABP11 de *Gobionotothen gibberifrons*; UniProt:O57666 (H6-FABP) (88) para una proteína denominada aquí FABP11 del pez dragón antártico (*Parachaenichthys charcoti*); GenBank:BAA92355 (89) para FABP3 de anguila japonesa (*Anguilla japonica*); deducida a partir del clon GenBank:BM028330 (90) para una proteína denominada aquí FABP3, deducida a partir del clon GenBank:BE574176 (91) para una proteína denominada aquí FABP7, y deducida a partir del clon GenBank:BM438483 (92) para una proteína denominada aquí FABP10 del bagre de canal (*Ictalurus punctatus*); deducida a partir del clon GenBank:BJ696441 (93) para una proteína denominada aquí FABP3 del salmón “Hippo Point” (*Ptyochromis sp.*); deducida a partir del clon GenBank:CF661735 (94) para una proteína denominada aquí FABP11 de carpa (*Cyprinus carpio*); GenBank:AM501530 (95) para una proteína denominada aquí FABP11 de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*).

Los números de acceso para las secuencias VLDLR/VtgR de vertebrados fueron: UniProt:P98155 de humanos (*Homo sapiens*), UniProt:P98156 de ratón (*Mus musculus*), UniProt:P98165 de pollo (*Gallus gallus*), UniProt:Q90W12 y UniProt:O73921 de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), UniProt:Q6NS01 de *Xenopus laevis*, UniProt:Q7ZTG7 de tilapia (*Oreochromis aureus*), UniProt:Q6Y857 de perca blanca (*Morone*



*americana*), y UniProt: Q2L4C1 de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*).

Los número de acceso para las secuencias de ARNm de *βactina* del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) fueron GenBank:DQ485686 y GenBank:501529.

#### 2.2.5. Análisis de las secuencias

Las secuencias nucleicas o protéicas fueron alineadas usando ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)). El péptido señal de la proteína deducida se predijo usando el software SignalP 3.0 ([www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)) usando “Hidden Markov models” sobre eucariotas. Los sitios putativos de O-glicosilación GalNAc se obtuvieron con el programa NetOGlyc 3.1 ([www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/)). El árbol filogenético y los índices de significación fueron estimados usando tres metodologías diferentes de reconstrucción filogenética: métodos de “neighbor-joining” (NJ), “maximum likelihood” (ML), e inferencia Bayesiana (BI), según describe Avarre et al., 2007. El algoritmo NJ se basó en el número de sustituciones de aminoácidos con el método de corrección de distancias de Poisson y la opción “pairwise deletion” para los sitios vacíos; los valores “bootstrap” se obtuvieron con 5.000 pseudoreplicados. El análisis ML se llevó a cabo con PHYML v2.4.4 empezando por el árbol BIONJ, la distribución gamma para el rango de heterogeneidad entre sitios ( $\Gamma$ ) fue modelada con una distribución  $\Gamma$  de 4 categorías y un parámetro de forma igual a 2. El modelo de sustitución WAG fue seleccionado por PrtTest v1.3. (Abascal et al., 2005), siguiendo el criterio de información Akaike, como el modelo que mejor se acoplaba de entre todos los modelos testados que se podían utilizar con PHYML. Los valores “bootstrap” se basaron en 500 pseudoreplicados para estimar el apo-

yo de los nodos del árbol ML. En los árboles no-paramétricos, los valores “bootstrap” de confianza  $\geq 80$  fueron aceptados como significantes. IB se llevó a cabo usando MrBayes v3.1.2 (Ronquist et al., 2003) con el modelo WAG de sustitución de amino-ácidos incluido en el paquete. Dos “runs” simultáneos, cada uno con cuatro Cadenas Markov Monte Carlo (CMMC), corrieron inicialmente con 1.600.000 generaciones, tras las cuales, la desviación estándar de las frecuencias fue de 0,009795. Se usaron los parámetros por defecto y en las CMMC obtenidas se investigó la convergencia de todos los parámetros, usando los comandos “sump y sump” de MrBayes. Los primeros 4.000 árboles anteriores al “log likelihood” se descartaron, y los siguientes 12.001 fueron usados para estimar la topología y los parámetros del árbol. El porcentaje de veces que un nodo ocurría dentro de esos 12.001 árboles era interpretado posteriormente como la probabilidad del nodo. Una representación gráfica del árbol consenso más probable fue representada y las ramas aceptadas como significativamente diferentes cuando la probabilidad era  $\geq 0,9$ .

#### 2.2.6. Análisis “Northern blot”

Se extrajo el ARN total de ovario previtelogénico (IGS: 1,5%, porcentaje de oocitos previtelogénicos: 99%, porcentaje de oocitos atrésicos: 1%), y vitelogénico (IGS: 11.3%, porcentaje de oocitos previtelogénicos: 10%, porcentaje de oocitos atrésicos: 5%) mediante el reactivo WIZ<sup>TM</sup> RNA isolation reagent (Ambion, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad del ARN total extraído fue verificada mediante tinción con bromuro de etidio y electroforesis en gel de agarosa-borax. Cada muestra de ARN total (10  $\mu\text{g}$ ) fue desnaturalizada durante 15 min a 70°C en 50% formamida, 10% formaldehído, 5% tampón borax 10x, 50 ng/ $\mu\text{l}$  de

bromuro de etidio y 5% de azul de bromofenol, separados por electroforesis en un gel de formaldehído/MOPS al 1,2% de agarosa conteniendo 16,8% de formaldehído y 10% de tampón borax 10x durante varias horas a 50V y 4°C para evitar la desnaturalización del ARN, y transferido entonces a membrana de nylon (Hybond-N, GE Healthcare).

Los ADNc utilizados para sintetizar la sonda se obtuvieron por PCR con los siguientes cebadores: VTGR-S2 (5'-TGGCWCTGGATGCA) y VTGR-AS2 (5'-CACATGTAGSNACAGCCTCC) para *vtgr*; y SHF3-S4 (5'-ATGGTTGAGAGTTTTGTTGGGAC) y SHF3-AS1 (5'-GTACGTCC TCACTGCGAC) para *fabp11*; los clones positivos aislados a partir del cribado de la genoteca se emplearon como plantilla. La temperatura de amplificación fue 55° y 56°C respectivamente. Los productos de PCR de 748-bp para el *vtgr*, desde los nucleótidos +1415 a +2162 (numerados desde el codón de inicio de la traducción), y de 390-pb para *fabp11*, desde los nucleótidos -30 a +360, fueron purificados por columna (NucleoSpin<sup>®</sup> Extract kit, Macherey-Nagel) y subclonados en el vector pGEMT-easy para producir los clones So-VTGR y So-FABP11. Las sondas fueron marcadas de manera idéntica a como se ha descrito arriba, así como la prehibridación e hibridación de las membranas. En este caso, no obstante, las membranas fueron lavadas con SSC 2x + 0,1% SDS a temperatura ambiente (2 x 10 min) y a 42°C durante 30 min. Las membranas hibridadas fueron expuestas a pantallas de fósforo durante 9 días a -80°C y reveladas con PhosphorImager (GE Healthcare).

#### 2.2.7. Análisis RT-PCR

Una reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR) se llevó a cabo a partir de 1 µg de ARN total aislado a partir de dife-

rentes tejidos en un volumen final de 20  $\mu$ l usando el enzima transcriptasa inversa M-MLV Superscript II RNase H Minus (Promega), 500 ng/ $\mu$ l del cebador universal Pt RACE (GGCCACGCGTCGACTAGTAC (T)<sub>15</sub>) y 500 ng/ $\mu$ l de cebadores hexaméricos aleatorios (“random primers”, Promega). Las hembras utilizadas, y por lo tanto el porcentaje de frecuencia de los diferentes estadios oocitarios en secciones histológicas, son las mismas que las usadas en el análisis “Northern blot”. El ADNc resultante fue utilizado para amplificar *vtgr*, *fabp11* y  *$\beta$ actina* por PCR en un volumen final 25  $\mu$ l, conteniendo 1,25 U de Taq DNA polymerase (Promega), 0,25 mM de dNTPs y 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0,76  $\mu$ M de cada cebador específico para *vtgr* y  *$\beta$ actina*. Los cebadores usados para amplificar *vtgr* fueron los mismos que aquellos utilizados para amplificar la isoforma *vtgr+* (S-og-S1 y S-og-AS1), y SHF3-S4 y SHF3-AS1 para amplificar *fabp11*. Para diseñar cebadores específicos para  *$\beta$ actina* de *S. senegalensis*, se amplificó un fragmento mediante PCR estándar usando ADNc de ovario como plantilla y generando los cebadores FishBA1 (5'-ACATGGAGAAGATCTGGC) y FishBA2 (5'-GCRTA CAGRTCCTTACGGA), determinados tras alinear secuencias de  *$\beta$ actina* de varios teleósteos disponibles en GenBank™ (datos no mostrados). Tras purificar el producto de PCR, subclonarlo en el sitio *EcoRI* del vector pGEMT-easy (Promega) y secuenciarlo, se diseñaron los cebadores específicos S-BAC-S (5'-GACCTTCAACACTCCTGC) y S-BAC-AS (5'-GTCACA CTTCATGATGCTG). Se llevó a cabo entonces una RT-PCR que incluyó una desnaturalización inicial de 94°C durante 3min, seguida de 30 ciclos (34 para *vtgr*) de amplificación a 94°C durante 30 seg, 57°C ( *$\beta$ actina*), 59°C (*vtgr*) ó 62°C (*fabp11*) durante 30 seg; 72°C durante 30 seg y una elongación

final de 72°C durante 3 min. Finalmente, los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 1,5% (2,5% para *vtgr*).

#### 2.2.8. Hibridación In Situ

Para elaborar las sondas de *vtgr* y *fabp11*, se siguió el protocolo de marcaje descrito en Morais et al. (2006) a partir de los clones So-VTGR y So-FABP11 también utilizados en el análisis “Northern blot”. El marcaje se realizó con digoxigenina usando T7 o SP6 RNA polymerase (Promega), y la solución digoxigenin labeling mix (Roche Diagnostics, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las sondas se purificaron mediante columnas (ProbeQuant G50, GE Healthcare) y su pureza y concentración fueron verificadas por electroforesis en gel de agarosa.

Los tejidos fijados en paraformaldehído (PFA) al 4% durante toda la noche (~ 16h) a 4°C y lavados dos veces con tampón fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM y PO<sub>4</sub> 0,02 M), fueron transferidos a metanol 100% y guardados a -20°C hasta el momento de su utilización. Para la hibridación in situ, los tejidos fueron lavados en etanol 100% (2 x 15 min.), tolueno (2 x 1h a 58°C), paraplast (2 x 1h a 58°C) y finalmente embebidos en paraplast y seccionados a 7 µm con un microtomo Leica RM 2125RT. Las secciones resultantes fueron precalentadas a 60°C, y desparafinadas por inmersión en tolueno (3 x 3 min), etanol 100% (2 x 3 min), etanol 95% (2 x 3 min), etanol 70% (2 x 3 min), etanol 50% (3 min), etanol 30% (3 min), NaCl 9/1000 (5 min); fijadas en PFA 4% en PBS 1x durante 20 min; lavadas en PBS 1x (2 x 5 min) y digeridas con 1 µg/ml de proteinasa K en tampón Tris/CaCl<sub>2</sub> (Tris/HCl 20 mM a pH 7,4 y CaCl<sub>2</sub> 2 mM) a 37°C durante 7 min; lavadas en PBS 1x; post-fijadas en PFA 4% (15 min) y lavadas durante 3 x 5 min en PBS 1x. La prehibridación se llevó a cabo por inmersión en la si-

guiente solución a pH 6,5: 50% formamida, citrato sódico 5x (SSC: NaCl 0,75 M y Na<sub>3</sub>citrato-2H<sub>2</sub>O 0,0075 M), 0,1% Tween 20, 50 µg/ml heparina, 500 µg/ml ARN de levadura (precalentado 5 min a 100°C) durante 15 min a 60°C. Tras desnaturalizar las sondas (40-50 ng/ml) durante 10 min a 70°C, y añadir las a nueva solución, las secciones fueron incubadas a 60°C toda la noche y lavadas en SSC 2x a 60°C (5-10 min), SSC 2x -50% formamida a 60°C (30 min), SSC 2x a 37°C (2 x 15 min), SSC 0.2x a 37°C (2 x 15 min), SSC 0.2x a temperatura ambiente (5 min), 50% SSC 0.2x+ 50% PBS 1x a temperatura ambiente (5-10 min), y lavadas dos veces en PBS 1x a temperatura ambiente. Las secciones fueron entonces bloqueadas en una solución de PBS-0,1% Tween 20, 2% plasma de oveja y 2 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) durante 1h e incubadas durante 2,5 h en dicha solución tras añadir fragmentos preabsorbidos de antidigoxigenina-AP Fab fragments de oveja (Roche Diagnostics) a la dilución final 1:5000. Después fueron lavadas en PBS 1x durante 5 min, seguido de PBS 1x (3 x 15 min) y mantenidas toda la noche en PBS 1x a 4°C. A la mañana siguiente fueron lavadas 2 x 10 min en tampón cromogénico (TrisHCl 100 mM pH =9,5, NaCl 100 mM y MgCl<sub>2</sub> 50 mM). BM purple (Roche Diagnostics) suplementado con 1 mM de levamisol fue utilizado como sustrato. La reacción colorimétrica se llevó a cabo en condiciones de oscuridad hasta que el color azul-púrpura, correspondiente a la localización de los transcritos, fue visible en cada sección. Entonces, la reacción fue parada durante 10 min en Tris/HCl 10 mM pH= 7.5 y EDTA 10 mM, refijadas en PFA 4% en PBS 1x durante 20 min, lavadas en PBS 1x (2 x 15 min) y montadas en glicerol 95% antes de ser observadas bajo microscopio Eclipse E1000 (Nikon, Francia) y fotografiadas con cámara digital DMX1200.

### 2.2.9. RT-PCR cuantitativa en tiempo real

El ARN total fue extraído del ovario de 18 hembras muestreadas en diferentes épocas del año, correspondiendo a diferentes IGS y porcentajes de atresia, mediante Qiagen RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen), seguido de tratamiento con DNasaI. El ARN fue cuantificado mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nyxor Biotech, Francia), con valores de  $A_{260}/A_{280}$  entre 2,00 y 2,06, y su integridad verificada por tinción con bromuro de etidio en gel de borax-agarosa. Transcripciones reversas (RT-PCRs) fueron llevadas a cabo con 0,1  $\mu$ g de ARN total usando el StrataScript® QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene) según las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción (20  $\mu$ l) fue incubada a 25°C durante 5 min, seguida de 1 hora a 42°C y inactivada a 95°C durante 5 min. Una RT control negativo (sin transcriptasa inversa) se llevó a cabo para cada muestra.

Las amplificaciones de RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) se realizaron en un volumen final de 20  $\mu$ l con 10  $\mu$ l de Brilliant® SYBR® Green QPCR master mix (Stratagene), 2  $\mu$ l del ADNc diluido (1/300), y cebadores específicos a 0,5  $\mu$ M (*vtgr* y  *$\beta$ actina*) ó 0,3  $\mu$ M (*fabp11*). Los cebadores diseñados para amplificar la secuencia de *vtgr* de 169-pb y la secuencia de la *fabp11* de 219-pb fueron VTGR-So-S1 (5'-CTGTGTTTGAGGACCGAGTGTT) y VTGR-So-AS1 (5'-GAGCACCCAGTTAGTTCCTGACA) y FABP11-So-S4 (5'-ATTTGAT CCTGAGCGTGGAC) y FABP11-So-AS3 (5'-CGTCTGAGATCTCCCTCTCG), respectivamente. Se diseñaron cebadores específicos para la  *$\beta$ actina* de *S. senegalensis*: Bact-So-S3 (5'-ACTGCTGCCTCCTCCTCCT) y Bact-So-AS3 (5'-ATGCTGTTGTTAGGTTGTCTCGTG), a partir de una secuencia publicada (Fernandez-Trujillo et al., 2006), generando un fragmento de 161-pb. Las

amplificaciones se llevaron a cabo usando el termociclador MX 3000P QPCR (Stratagene). El ciclo de PCR constó de una desnaturalización de 95°C durante 10 min, seguida de 35 ciclos (30 para *βactina*) de amplificación a 95°C durante 30 seg; 61°C (*βactina* y *fabp11*) ó 63°C (*vtgr*) durante 30 seg; 72°C durante 30 seg y un ciclo final de 95°C durante 60 seg, 55°C durante 30 seg y una rampa final hasta 95°C, a 0,01°C/seg, donde los datos fueron recogidos en continuo para obtener una curva de disociación. El tamaño de los productos de qPCR fueron verificados por gel de agarosa al 2%, purificados y secuenciados. Las determinaciones de qPCR fueron llevadas a cabo por triplicado para cada muestra. No se observó amplificación en las RT negativas realizadas sin enzima y no se formó ningún tipo de dímero entre los cebadores en los controles sin muestra.

Para ensayar la reproducibilidad inter-ensayo, tres curvas estándar independientes fueron generadas, una de ellas en la misma placa que las muestras determinadas, usando 9 diluciones seriadas (de 4,0 a 0,016 ng) de un pool formado a partir del ADNc de primera cadena de todas las muestras. Las curvas estándar representan el valor de Ct en función del número de copias generadas, atribuidas de forma arbitraria como 1 copia para el estándar más diluido. La eficiencia de la qPCR fue siempre mayor que 97,6%, y el coeficiente de correlación ( $R^2 \geq 0,992$ ) para cada gen estudiado. Además, se realizó un control de calidad para qPCR, tal y como sugiere Yuan et al. (2006), con el fin de determinar si las diferencias en las concentraciones de los diferentes transcritos entre muestras se debía a diferentes eficiencias de amplificación. Para ello, nueve muestras, representativas de todos los estadios gonadales de desarrollo, fueron amplificadas por duplicado en tres diferentes diluciones seriadas para cada gen (1/31, 1/310 y 1/3100), y se exami-



nó la correlación entre el umbral de ciclo (Ct) y el logaritmo (base 2) transformado de la concentración de muestra.

Para normalizar los resultados de qPCR, el ADN genómico y el ARN total se determinó a partir de 2 µl de la dilución 1/100 del homogeneizado de ARN total generado en el Qiagen RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen). El ADN genómico y el ARN total fueron cuantificados mediante los kits de ensayo Quant-iT™ dsDNA HS y Quant-iT™ (Invitrogen, Eugen, Oregon, USA), respectivamente, usando un fluorímetro Qubit™ (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados de qPCR fueron normalizados por el ratio ARN/ADN y expresados como copias de transcrito por ng de ADN genómico. La cantidad de transcrito *βactina* también fue utilizada para expresar los resultados como el número de copias de cada gen estudiado dividido por el número de copias del mismo gen normalizado.

#### 2.2.10. Análisis estadístico

Para analizar la calidad de los datos obtenidos por q-PCR, se utilizó el modelo de correlación y el programa SAS desarrollado por Yuan et al. (2006), disponible en [www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2105-7-85-S1.sas](http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2105-7-85-S1.sas), con el programa estadístico SAS (SAS Institute, USA). Las variaciones en los niveles de transcritos normalizados fueron analizadas en busca de significancia estadística por regresión lineal y correlación (test de Spearman Rank Order), usando el software SigmaStat 3.1 (Systat Software GmbH, Alemania). El nivel de significancia se estableció en 0,05.

### 2.3. Resultados

#### 2.3.1. Caracterización molecular de las dos variantes de “splicing” del *vtgr* de *Solea senegalensis*

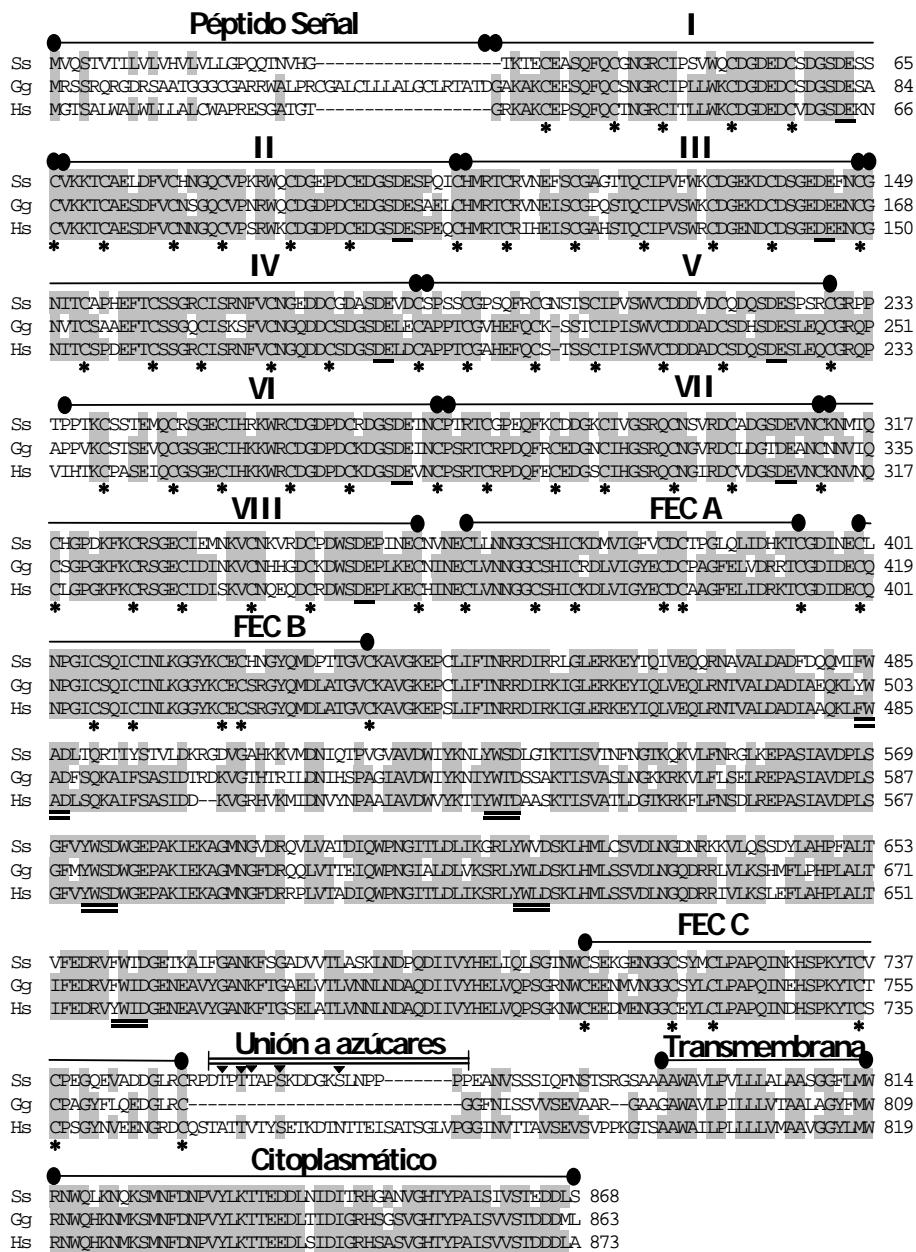
La secuencia completa ADNc del *vtgr*, deducida a partir del clon S9A5 procedente del cribado de la genoteca de ovario, incluyendo ambas variantes de “splicing”, se ha depositado en GenBank™/EBI Data Bank bajo el número de acceso AJ879619. El ADNc de 3968-pb está formado por 173-pb en la región 5' no codificante, seguidos de 2547-pb de región codificante correspondiente a la forma no-glicosilada (VtgR-), y 1248-pb correspondientes al extremo 3' no codificante incluyendo la cola poli A en la posición 3951. La secuencia de la proteína deducida consta de 848 aminoácidos de longitud. Se predice un péptido señal de 27 aminoácidos, que da lugar a una proteína madura de 821 aminoácidos, con una masa molecular de 90.595 Da. La PCR llevada a cabo con los cebadores flanqueantes al dominio de unión a azúcares, permitió encontrar una región de 60-pb en la región codificante (correspondiente a la forma VtgR+), y que da lugar a un ADNc de 4.028-pb. La proteína resultante de este ADNc está formada por 841 aminoácidos con una masa molecular de 92.612 Da (Fig. 2.1.). Cinco sitios potenciales de glicosilación GalNAc se predijeron en el putativo sitio de unión a azúcares.

El VLDLR/VtgR muestra un elevado grado de homología respecto al de otras especies. La comparación de la secuencia de aminoácidos deducida del ADNc de VtgR+ de lenguado con el VLDLR humano y el VLDLR/VtgR de pollo y *Xenopus*, reveló un 69,5%, 69,8%, y 67% de identidad respectivamente, mientras que la identidad fue del 83,4% al 89,8% cuando se comparó con las secuencias de VtgR- homólogas de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), tilapia (*Oreochromis aureus*), y perca blanca

(*Morone americana*). La comparación entre dominios específicos reveló elevada homología dentro del linaje de los vertebrados entre los diferentes dominios de unión a ligando tipo A, los cuales contienen ocho repeticiones con seis cisteínas cada uno, que presumiblemente median la fusión del dominio en una estructura rígida con clusters de residuos cargados negativamente sobre su superficie (concretamente el tripéptido Ser-Asp-Glu, SDE). También se encontró un elevado grado de conservación entre las regiones A, B y C del precursor del factor de crecimiento epidérmico (FCE), conteniendo su región B: repeticiones YWTD en tándem, que supuestamente crean estructuras de hoja- $\beta$ ; el dominio de unión a azúcares; y un muy conservado dominio citoplasmático que incluye el putativo dominio FDNPVY posiblemente responsable de la endocitosis del ligando tras su unión a receptor (Fig. 2.1.).

---

**Fig. 2.1.** Alineamiento de la secuencia VtgR+ de *Solea senegalensis* con las secuencias homologas de *Gallus gallus* (Gg) y *Homo sapiens* (Hs). Los aminoácidos se numeran a partir de la metionina de inicio. Residuos idénticos a la secuencia del lenguado senegalés se indican coloreados en gris. Los huecos insertados para optimizar los alineamientos están indicados por guiones. El receptor consta de los dominios indicados sobre el alineamiento múltiple. Las ocho repeticiones ricas en residuos de cisteína, también denominados clusters de repeticiones LA, numerados de I-VIII forman el dominio de unión a ligando. Los asteriscos bajo la secuencia humana indican residuos de cisteína conservados en LA y en las repeticiones de tipo A, B, y C del FCE. Las repeticiones de seis residuos de cisteína que presumiblemente median la fusión del dominio en una estructura rígida con clusters de residuos cargados negativamente en su superficie, con la secuencia SDE, están subrayados bajo la secuencia humana. La repetición YW(T)D encontrada en repeticiones en tandem, y que se supone forma estructuras de hoja- $\beta$ , está marcada con doble subrayado. Las cinco flechas sobre el alineamiento indican cinco sitios potenciales de glicosilación GalNAc en la secuencia de lenguado. El motivo FDNPVY del putativo dominio citoplasmático está muy conservado, que participa en la endocitosis del ligando tras su unión al receptor, está subrayado bajo la secuencia humana.



2.3.2. Caracterización molecular y relaciones filogenéticas de FABP11 de *Solea senegalensis*

La secuencia completa de ADNc de *fabp11* fue deducida a partir del clon quimérico S8A2 aislado durante el cribado de la genoteca de ovario, fue depositado en GenBank™/EBI Data Bank bajo el número de acceso GenBank:AM501530. Los 839-pb de su secuencia completa, consistieron en 47-pb en la región 5' no-codificante, seguido de 405-pb correspondiente a la pauta de lectura abierta, y 370-pb pertenecientes a la región 3' no-codificante. La secuencia de la proteína deducida constó de 134 aminoácidos con una masa molecular teórica de 15.044 Da (Fig. 2.2.).

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de FABP11 de *Solea* con otras secuencias de FABPs humanas (Fig. 2.2.) y de otros peces teleósteos previamente caracterizadas o extraídas de bases de datos, reveló una homología del 75,6% al 85,1% con FABPs de otros peces teleósteos, mientras que la homología hallada con formas duplicadas de FABP11 encontradas en el pez cebra fue del 63,4% y 82,1%. Un grado de homología mucho menor se encontró con diferentes secuencias de FABP4/FABP5/FABP8/FABP9 de tetrápodos (p.e. 54.5% y 52.2% con FABP4 y FABP8 humanas respectivamente) y todavía menos con los tipos FABP1/FABP6/FABP10 de tetrápodos, (p.e. 27.1% y 23 % con FABP1 y FABP6 humanas respectivamente).

La relación evolutiva entre los genes de la familia FABP en vertebrados fue evaluada tras alinear la secuencia de determinadas proteínas de cada subfamilia. El análisis filogenético se llevó a cabo usando los métodos NJ, ML e IB (Fig. 2.3.). El árbol filogenético separó con confianza varios clusters: FABP1/FABP6/FABP10 (grupo N°1), FABP2 (grupo N°2), y FABP3/FABP4/FABP5/FABP7/FABP8/FABP9/FABP11 (grupo N°3) (NJ:



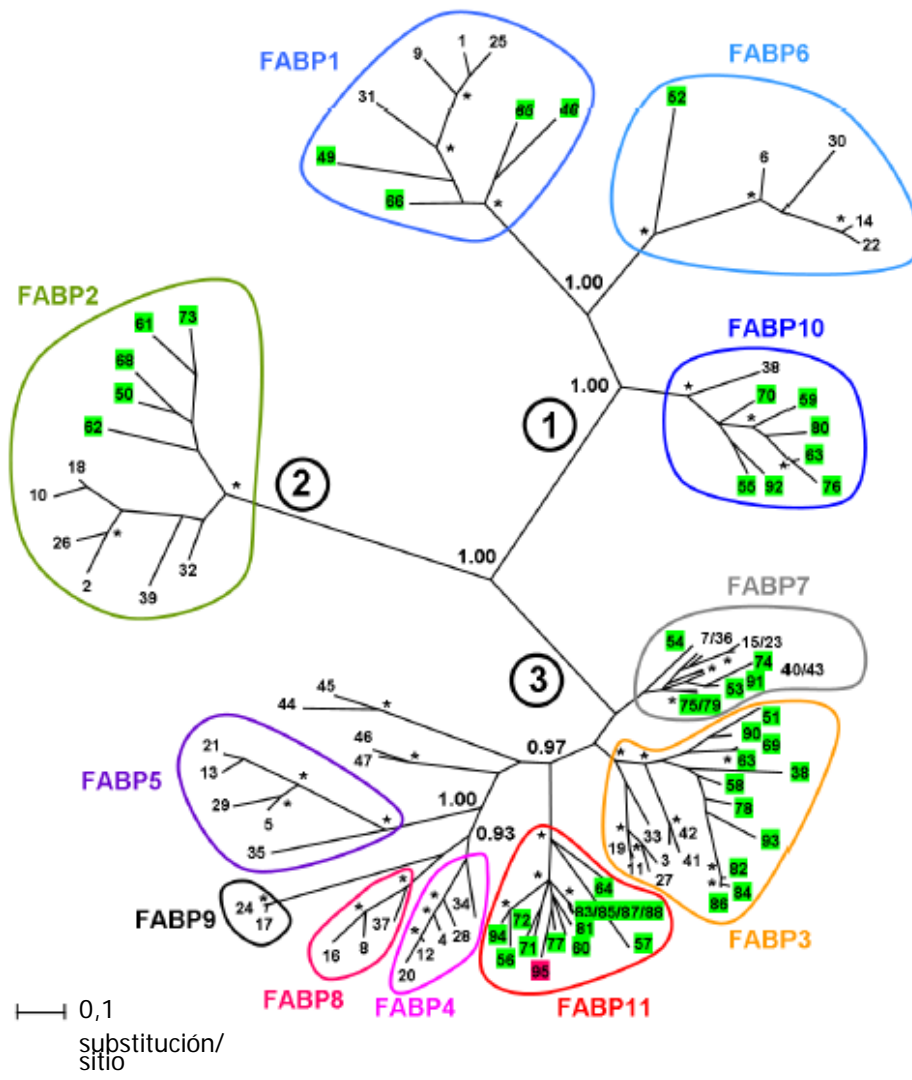
**Fig. 2.2.** Comparación de las secuencias aminiacídicas de FABP11 de *Solea senegalensis* (Ss) con FABPs de *Homo sapiens* (Hs). Los aminoácidos se numeran a partir de la metionina de inicio. Residuos idénticos a la secuencia del lenguado senegalés se indican coloreados en gris. Los huecos insertados para optimizar los alineamientos están indicados por guiones. Sitios con aminoácidos idénticos en todas las secuencias están indicados por asteriscos bajo el alineamiento. La inserción de aminoácidos, posición 46 en la FABP11 de lenguado senegalés, se ha encontrado en todas las secuencias de FABP de peces teleósteos actualmente disponibles en las bases de datos y no identificadas en los clusters FABP3/FABP4/FABP5/FABP7/FABP8/ FABP9 y FABP2 de vertebrados.

$\geq 100$ ; ML:  $\geq 100$ ; IB: 1,00). Las ramas significativas internas de FABP del grupo N°3 definieron tres subgrupos de secuencias FABP. El primero fue la subfamilia FABP3 (NJ: 80; ML: 82; BI: 1,00), el segundo fue la subfamilia FABP7 (NJ: 99; ML: 92; BI: 0,97), y el tercer subgrupo formó una rama monofilética, sugiriendo que estas tres proteínas derivan de un mismo ancestro común, el cual abarca las subfamilias FABP4/FABP5/FABP8/FABP9/FABP11. FABP11 constituyó una nueva subfamilia FABP, la cual parece ser específica de peces teleósteos (NJ: 97; ML: 97; BI: 1,00). Esta afirmación también está reforzada por la presencia de una inserción aminoacídica en la posición 46 de FABP11 de lenguado senegalés, encontrada en todas las secuencias FABP11 actualmente disponibles en las bases de datos y no identificada en la secuencia de otras subfamilias del grupo N°3, p.e.

FABP3/FABP4/FABP5/FABP7/FABP8/FABP9. Deberíamos resaltar que una única inserción estaba presente en las secuencias del grupo N°1, pero no del grupo N°2. El método IB apoyó con significancia que la subfamilia FABP11 sea una rama hermana del cluster FABP4/FABP5/FABP8/FABP9 de tetrápodos (IB: 0,97). Este cluster contiene sólo secuencias de tetrápodos y ha sido dividido significativamente (IB: 1,00) en dos ramas internas, correspondientes a la subfamilia FABP5 (NJ: 99; ML: 100; IB: 1,00) por una parte y FABP4/FABP8/FABP9 (IB: 0,93) por otra. También debemos subrayar que las secuencias identificadas como isoformas duplicadas del pez cebra; p.e. FABP1, FABP7, y FABP11, resultantes de una amplia duplicación genómica en peces teleósteos, fueron agrupadas con sus respectivas subfamilias.

---

**Fig. 2.3.** Reconstrucción filogenética por Inferencia Bayesiana (BI) de la familia FABP en vertebrados. El árbol se basa en el alineamiento de las secuencias aminoácidas de todas las secuencias FABP de teleósteos disponibles actualmente en las bases de datos y de una selección de secuencias de tetrápodos. Las secuencias están indicadas por números de acuerdo al código ofrecido al designar la secuencia, tal y como se detalla en la sección de material y métodos. Los números de las secuencias de FABP de peces teleósteos y del lenguado senegalés están remarcadas en verde y rojo respectivamente. La longitud de las ramas es proporcional a las estimaciones BI de las substituciones de aminoácidos ocurridas, y los números de cada nodo indican la probabilidad de MrBayes, estimada por el modelo, sobre la suma de 12.001 árboles. Se muestran las probabilidades  $\geq 0,90$ . Debido a la limitación de espacio, un asterisco indica que la probabilidad dentro de subfamilias es 1,00. Los números en el interior de círculos indican diferentes grupos de FABPs.

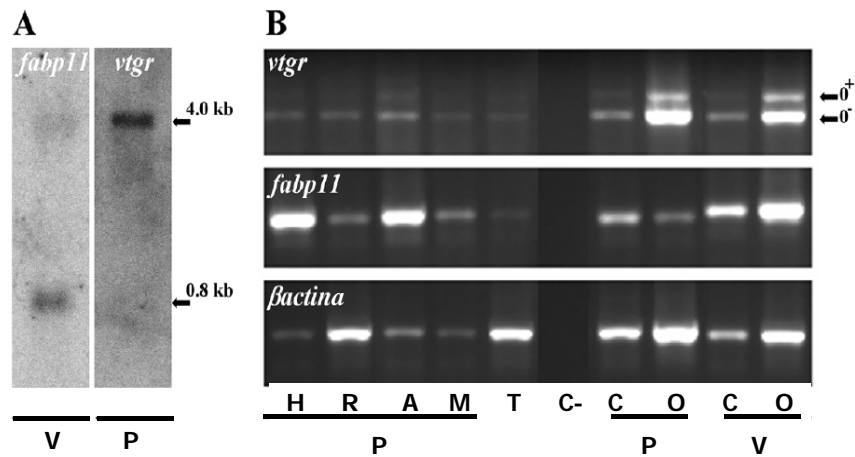




2.3.3. Expresión diferencial de *vtgr* y *fabp11* en tejidos de *Solea senegalensis* adulto

El análisis “Northern blot” del ARN extraído de un ovario previtelogénico reveló una única e intensa banda del transcrito *vtgr* de aproximadamente 4,0-kb, correspondiente al tamaño de VtgR+ y VtgR- (Fig. 2.4.A). La misma metodología aplicada al ARN extraído de un ovario vitelogénico reveló un transcrito de *fabp11* de 0,8-Kb correspondiente al tamaño del transcrito clonado.

El análisis de la expresión de *vtgr* por RT-PCR usando cebadores específicos flanqueantes al dominio de unión a azúcares, detectaron ambas variantes de “splicing” en ovario, tanto previtelogénico como vitelogénico. Sin embargo, se pudo amplificar en mayor proporción la banda de menor tamaño (291 pb), correspondiente a la isoforma VtgR-, que la banda más pesada (351 pb), la cual contiene los 60 pb adicionales codificantes del dominio de unión a azúcares, isoforma VtgR+ (Fig. 2.4.B). La expresión de ambas isoformas se detectó levemente en corazón y tejido adiposo, y ya muy tenuemente en hígado, riñón, músculo y testículo. La expresión tisular de los transcritos de *fabp11* y *βactina* también fue investigada por RT-PCR y se demostró amplificación de los productos específicos a partir de ARN total en todos los tejidos examinados (Fig. 2.4.B). Los niveles de transcripción de *fabp11* fueron claramente mayores en hígado, tejido adiposo y ovario vitelogénico, mientras que poca o muy poca cantidad fue amplificada en ovario previtelogénico, corazón, riñón, músculo y testículo. En las condiciones utilizadas, la *βactina* fue muy amplificada en ovario, riñón, testículo y corazón, y menos amplificada en hígado, tejido adiposo y músculo.



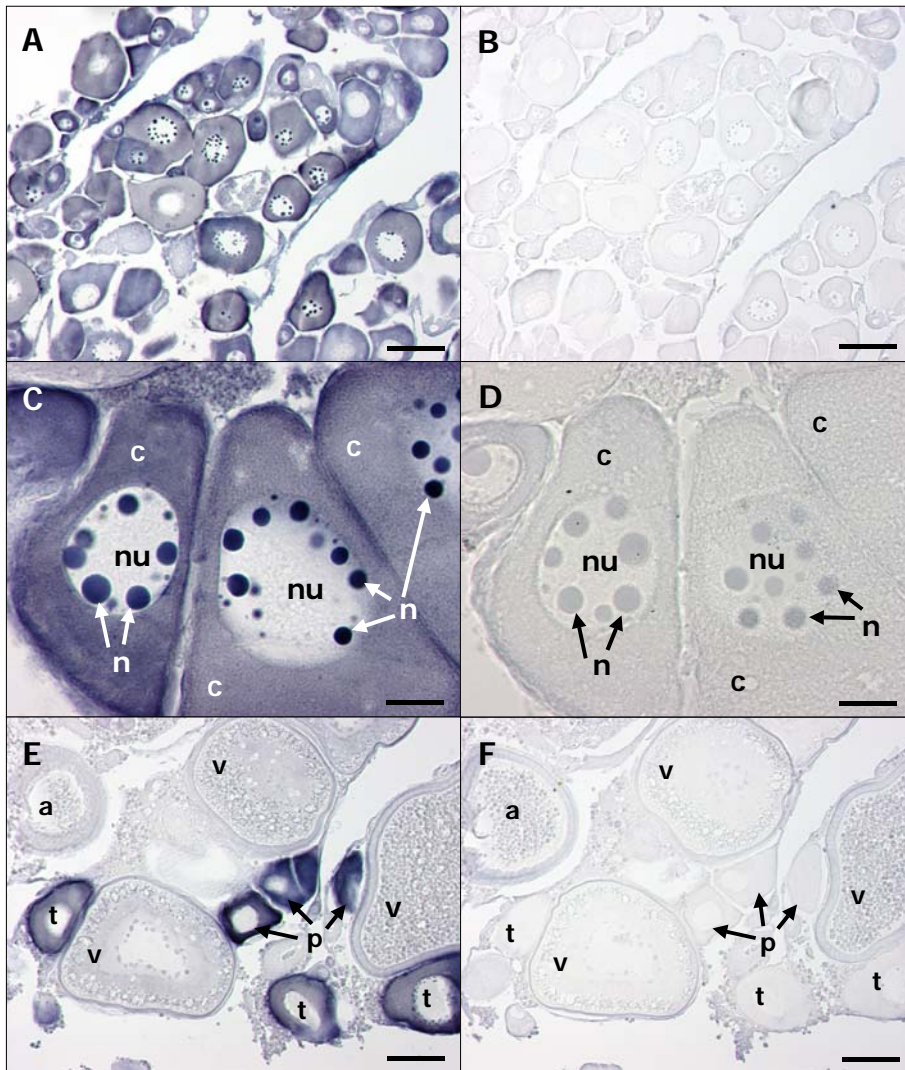
**Fig. 2.4.** Expresión de *vtgr*, *fabp11*, y *βactina* en tejidos adultos de *Solea senegalensis*. **(A)**: Hibridación “Northern blot” del ARN total aislado de un ovario de hembra vitelogénica (V) o previtelogénica (P). Las muestras de ARN purificado (10 µg) fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído, y las membranas hibridadas con sondas de *fabp11* o *vtgr* marcadas radioactivamente con  $P^{32}$ . El tamaño mostrado por las bandas de hibridación es relativo a la movilidad del estándar de ARN. **(B)**: Transcritos de *vtgr*, *fabp11*, y *βactina* detectados por RT-PCR a partir de ARNs extraídos de tejidos adultos. Los productos de PCR fueron generados a partir de ARN total extraído de hembra previtelogénica (P) o vitelogénica (V) y a partir de macho, usando cebadores de ADNc específicos. Los diferentes tejidos adultos utilizados fueron: hígado (H), riñón (R), tejido adiposo (A), músculo (M), testículo (T), corazón (C), y ovario (O). Un control negativo (C-), al cual no se añadió transcriptasa inversa, no generó productos de RT-PCR. Las dos variantes de “splicing” alternativas, transcritos con (O+) o sin (O-) dominio de unión a azúcares, están indicados a la derecha.

#### 2.3.4. Localización celular de los transcritos *vtgr* y *fabp11* en ovario

El desarrollo ovárico del lenguado es grupo sincrono, observándose dos grupos de oocitos, uno desarrollándose, y otro en estadio previtelogénico. Las hibridaciones in situ se llevaron a cabo sobre secciones de ovario en diferentes estadios de desarrollo, usando una sonda antisentido capaz de detectar ambas variantes VtgR- y VtgR+. Una fuerte señal de hibridación de *vtgr* se localizó en el citoplasma y los nucleolos de los oocitos previtelogénicos con la sonda antisentido, (Fig. 2.5.A, C, E), mientras que la hibridación con la sonda en sentido no produjo ninguna señal (Fig. 2.5.B, D, F). La señal de tinción también fue ausente en oocitos vitelogénicos, así como en las células somáticas de la teca y granulosa (Fig. 2.5.E).

---

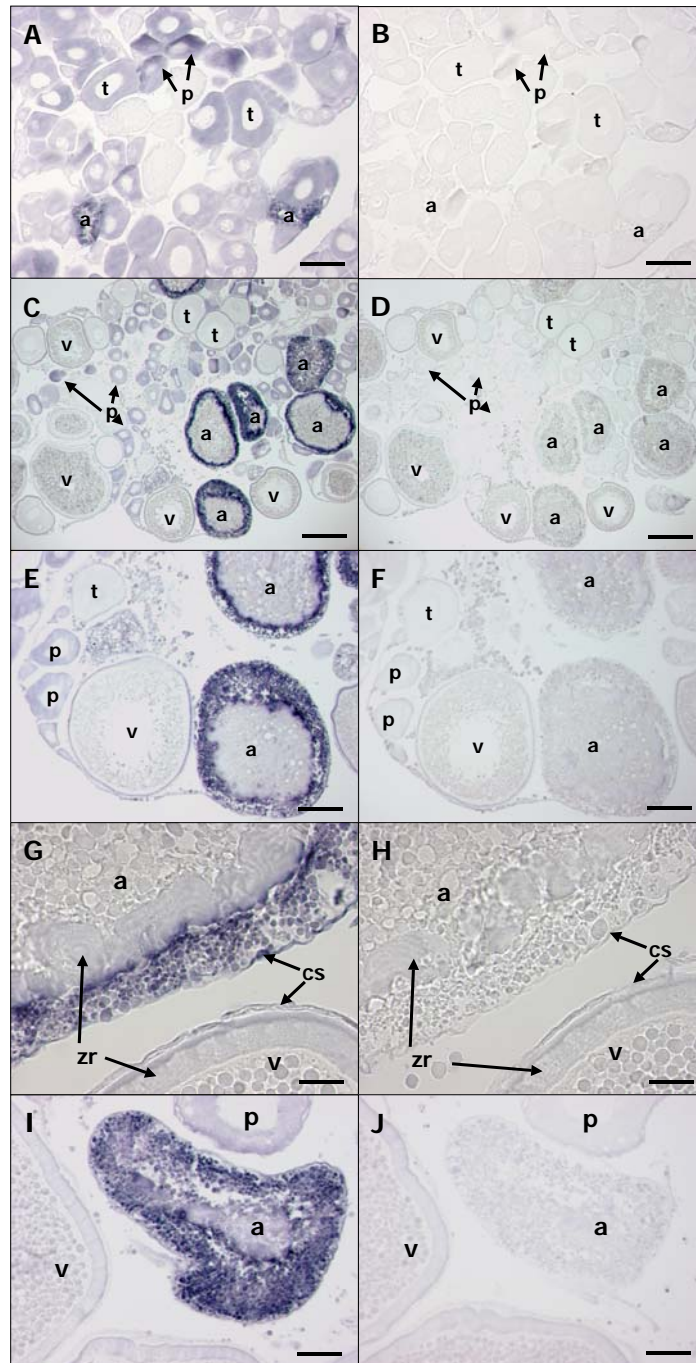
**Fig. 2.5.** Localización celular de los transcritos de *vtgr* en ovario de *Solea senegalensis*. La Hibridación in situ sobre secciones histológicas de una hembra previtelogénica (**A-D**) (IGS: 1,5%, porcentaje de oocitos previtelogénicos: 99%, porcentaje de oocitos atrésicos: 1%) y otra vitelogénica (**E-F**) (IGS: 11,3%, porcentaje de oocitos vitelogénicos: 10%, porcentaje de oocitos atrésicos: 5%). Las secciones tratadas con sondas marcadas con digoxigenina en anti-sentido (**A, C, E**), o en sentido, (**B, D** y **F**). La señal de hibridación se muestra en color azul oscuro a violeta. No se detecta señal de hibridación en las secciones tratadas con la sonda en sentido. Los transcritos están localizados en grandes concentraciones en el citoplasma (c) y los nucleolos (n) de oocitos previtelogénicos (p). a, oocito atrésico; nu, núcleo; (v) oocito vitelogénico; (t) oocito en vitelogénesis temprana. La escala utilizada es 100  $\mu\text{m}$  en (**A, B, E, F**), y 16  $\mu\text{m}$  en (**C, D**).



La distribución del ARNm de *fabp11* en ovario reveló señal de hibridación en el citoplasma de oocitos en previtelogénesis (Fig. 2.6.A, C, E). Una señal muy fuerte se observó en las células somáticas de los folículos atrésicos tanto en ovario previtelogénico (Fig. 2.6.A) como vitelogénico (Fig. 2.6.C, E, G, I). Los folículos atrésicos se caracterizan por la desintegración del núcleo (Fig. 2.6.E), la rotura de la zona radiata y la modificación de la apariencia de los gránulos de vitelo, así como por un incremento en el número y tamaño de las células foliculares externas al oocito (Fig. 2.6.G), dando folículos atrésicos que expresaban fuertemente los transcritos de *fabp11* (Fig. 2.6.A, C, E, G, I). No se detectó señal ni en el citoplasma de los oocitos vitelogénicos (Fig. 2.6.C, E, G, I) ni en las secciones tratadas con la sonda en sentido (Fig. 2.6.B, D, F, H, J).

---

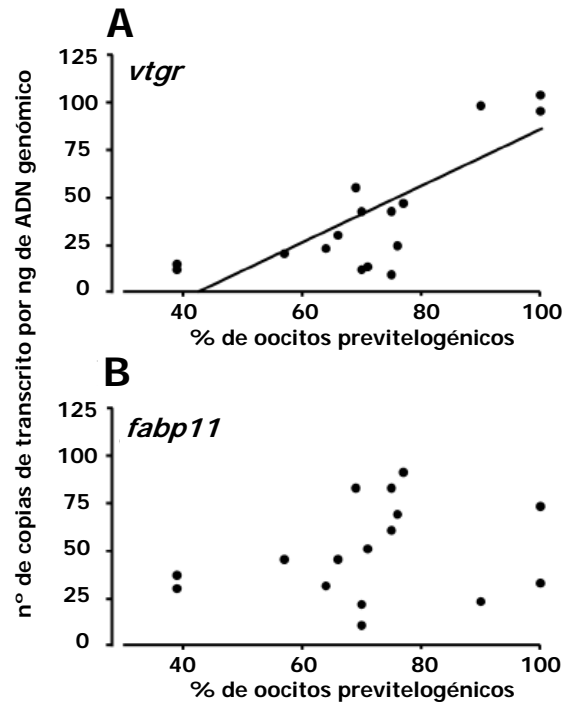
**Fig. 2.6.** Localización celular de los transcritos de *fabp11* en ovario de *Solea senegalensis*. La Hibridación in situ sobre secciones histológicas de una hembra previtelogénica (**A-B**) (misma hembra que en la Fig. 2.5.) y otra vitelogénica (**C-J**) (IGS: 4%, porcentaje de oocitos vitelogénicos: 6%, porcentaje de oocitos atrésicos: 5%). Las secciones tratadas con sondas marcadas con digoxigenina en anti-sentido (**A, C, E, G, I**), o en sentido, (**B, D, F, H, J**). La señal de hibridación se muestra en color azul oscuro a violeta. No se detecta señal de hibridación en las secciones tratadas con la sonda en sentido. Se localiza una señal moderada en el citoplasma (c) de oocitos previtelogénicos (p). Elevados niveles de expresión del transcrito *fabp11* se detectan en las células somáticas (cs) que envuelven los oocitos atrésicos (a). t, oocito en vitelogénesis temprana; nu, núcleo; v, oocito vitelogénico; zr, zona radiata. La escala utilizada es 250  $\mu\text{m}$  en (**C, D**), 100  $\mu\text{m}$  en (**A, B, E, F**), 50  $\mu\text{m}$  en (**I, J**), y 25  $\mu\text{m}$  en (**G, H**).



2.4. Expresión diferencial de *vtgr*, *βactina* y *fabp11* durante la oogénesis evaluada por qPCR

El modelo de correlación empleado para realizar el análisis de calidad sobre 9 muestras representativas reveló, primero, una relación lineal simple para cada combinación entre genes y muestras, con pendientes no significativamente diferentes de  $-1$  y, segundo, pendientes muy similares para las tres combinaciones de genes y muestras, no significativamente diferentes unas de otras (datos no mostrados). Este test por tanto confirmó la aceptabilidad de los datos obtenidos por qPCR y la inexistencia de algún efecto debido a la dilución de las muestras (Yuan et al., 2006).

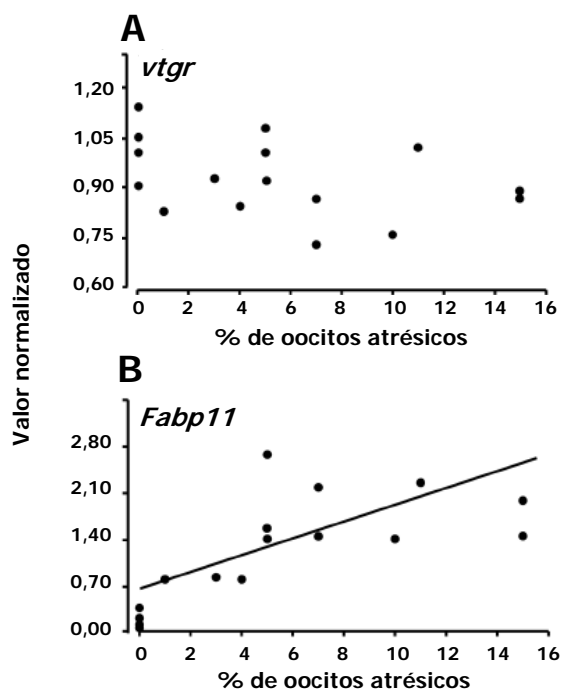
Los niveles de expresión de los transcritos *βactina*, *vtgr* y *fabp11* se determinó por qPCR en muestras de ovario obtenidas a partir de 16 hembras en diferentes estadios de desarrollo gonadal. El nivel del transcrito *βactina* fue inicialmente determinado con la intención de usarlo como gen de referencia y normalizar los datos. Sin embargo, se observó que la cantidad del transcrito *βactina* fluctuaba dependiendo del estadio de vitelogénesis. La expresión de *βactina* mostró una correlación significativamente positiva con el porcentaje de oocitos previtelogénicos (datos no mostrados) y negativa con el porcentaje de oocitos vitelogénicos (datos no mostrados), imposibilitando así su uso como gen de referencia en nuestro estudio. Otros autores ya han puesto de manifiesto que los genes constitutivos no son siempre buenos genes de referencia (Lee et al., 2006) y han propuesto nuevos métodos para normalizar datos provenientes de qPCR o microarrays (Hill et al., 2001; van de Peppel et al., 2003; Kanno et al., 2006). Consecuentemente, nuestros datos de qPCR, p.e. Ct's de las diluciones seriadas de la curva estándar convertidas a número de copias, fueron normalizadas por el ratio ARN/ADN



**Fig. 2.7.** Correlación entre el número de copias de los transcritos estudiados y el porcentaje de oocitos previtelogénicos en ovario de *Solea senegalensis*. (A): *vtgr* (B): *fabp11*. El porcentaje de folículos ováricos en previtelogénesis contados a partir de secciones histológicas de ovario y la cantidad de transcritos *vtgr* o *fabp11* fue cuantificada por qPCR a partir de 16 hembras. El nivel de transcrito fue normalizado por el ratio ARN/ADN genómico en la muestra y el número de copias del transcrito seleccionado se expresó como número de copias de transcrito por ng de ADN genómico. La regresión lineal en (A) fue:  $y = -67,54 + 1,47x$ ,  $r^2 = 0,586$ ; la pendiente fue significativamente diferente de cero a  $P = 0,0005$ ,  $r$  (no-paramétrica, Spearman) = 0,521,  $P$  (dos-colas) = 0,039.

genómico. Tal y como vimos a nivel visual sobre las secciones histológicas, los datos de qPCR demuestran una correlación significativamente positiva entre los niveles de expresión de *vtgr* y el porcentaje de oocitos previtelogénicos (Fig. 2.7.A), y negativa con respecto al porcentaje de oocitos vitelogénicos (datos no mostrados). Por el contrario, los niveles del transcrito *fabp11*





**Fig. 2.8.** Correlación entre el número de copias de los transcritos estudiados y el porcentaje de oocitos atrésicos en ovario de *Solea senegalensis*. **(A):** *vtgr* **(B):** *fabp11*. El porcentaje de folículos atrésicos contados a partir de secciones histológicas de ovario y la cantidad de transcritos *vtgr* o *fabp11* fue cuantificada por RT-PCR cuantitativa (qPCR) a partir de 16 hembras. La cantidad del transcrita *βactina* también fue cuantificada y los resultados mostrados corresponden al número de copias de *vtgr* o *fabp11* divididos por el número de copias del transcrita *βactina* usado como gen normalizador. La regresión lineal en **(A)** fue:  $y = 0,63 + 0,08x$ ,  $r^2 = 0,334$ ; la pendiente fue significativamente diferente de cero a  $P = 0,0019$ ,  $r$  (no-paramétrica, Spearman) = 0,755,  $P$  (dos-colas) = 0,0007.

no fueron significativamente afectados por el porcentaje de oocitos previtelogénicos (Fig. 2.7.B) en secciones de ovario.

Probablemente debido a la gran cantidad de células somáticas alrededor de los oocitos atrésicos (Fig. 2.6.E, G, I), no se obtuvo una fuerte correlación entre los niveles de los transcritos *vtgr*, *βactina* y *fabp11*, normali-

zados por del ratio ARN/ADN genómico, y el porcentaje de folículos atrésicos en secciones histológicas. Sin embargo, sí es posible el uso de *βactina* como gen de referencia para la atresia, ya que no se observa ningún tipo de correlación entre los niveles del transcrito *βactina* y el porcentaje de folículos atrésicos (datos no mostrados). No se detectaron cambios en la expresión de *vtgr* en relación al porcentaje de folículos atrésicos (Fig. 2.8.A). En cambio, los niveles del transcrito *fabp11* sí fueron correlacionados significativamente con el número de folículos atrésicos en secciones histológicas de ovario (Fig. 2.8.B). Deberíamos destacar, que en lenguado senegalés en condiciones de cautividad, la atresia parece darse en todos los estadios de desarrollo folicular pero su prevalencia está significativamente correlacionada con el número de oocitos vitelogénicos (datos no mostrados).

#### **2.4. Discusión**

El crecimiento oocitario, especialmente en especies ovíparas, se caracteriza por un intenso almacenamiento de productos (p.e. ARNs, proteínas, lípidos, vitaminas y hormonas) que posibilitan el posterior desarrollo de un embrión viable. En aves, el receptor de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLR), también denominado LDLR relativo con 8 repeticiones de unión a ligando (LR8) o VtgR, es un receptor de VLDL y también de Vtg, tal y como se ha demostrado en pollo tanto por pruebas bioquímicas como genéticas (Bujo et al., 1994, 1995). Estas lipoproteínas son selectivamente secuestradas por los oocitos en crecimiento a través de endocitosis mediada por receptor (Bujo et al., 1995; Perry y Gilbert, 1979). En mamíferos, la estructura de los VLDLR es prácticamente idéntica a los LDLR, excepto que su dominio de

unión a ligando posee 8 repeticiones LA en lugar de 7 (Takahashi et al., 1992). En vertebrados, dependiendo del “splicing” diferencial tenemos variantes de VLDLR. La variante más larga y predominante en tejidos mamíferos posee un exón adicional correspondiente al dominio de unión de azúcares, similar al que está presente siempre en los LDLR (con 28-30 aa). Por otra parte, los oocitos de pollo expresan una variante más corta llamada LR8- que codifica un receptor sin el dominio de unión a azúcares, mientras que las células somáticas y los tejidos, en particular las células de la granulosa que envuelven a los oocitos, expresan predominantemente LR8+ (Bujo et al., 1995ab; Nimpf et al., 1998). La función del dominio de unión a azúcares no está muy clara, pero se le sugiere responsable del control del reciclaje y degradación del receptor (Iijima et al., 1998; Magrané et al., 1999).

El VtgR de algunas especies de teleósteos fue inicialmente caracterizado y mostrado como un receptor con elevado grado de identidad entre aminoácidos con el VtgR de *Xenopus* (Okabayashi et al., 1996) y de pollo (Bujo et al., 1994). El VtgR de salmón (*Oncorhynchus kisutch*) fue identificado por hibridación a ligando y demostró poseer reacción cruzada con los sistemas de *Xenopus* y pollo, en términos de reconocimiento y inmunoreactividad. Además, su capacidad de unión a ligando es inhibida por la droga poli-aniónica suramina (Stifani et al., 1990). La clonación molecular del ADNc del VtgR de trucha arco iris resultó en la caracterización de una proteína de 97-kDa que contenía un dominio de unión a ligando con 8 repeticiones LA, a la que le faltaba el dominio de unión a azúcares y supuestamente activa endocíticamente a través del motivo FDNPVY en el dominio citoplasmático (Davail et al., 1998). La caracterización molecular del receptor homólogo en la perca blanca (Tao et al., 1996; Hiramatsu et al., 2004) y en tilapia (Li et al., 2003) demostró, al igual que en la trucha arco iris, la pre-

sencia de un receptor de lipoproteínas ovárico con 8 repeticiones LA, al que faltaba el dominio de unión a azúcares, y que se expresaba fuertemente en ovario, tal y como se demostró primero en pollo. Un segundo ADNc, diferente en 105 nucleótidos que se añaden y que codifican el dominio de unión a azúcares, ha sido identificado en trucha arco iris y su expresión encontrada en ovario, músculo, hígado, bazo, corazón e intestino (Prat et al., 1998). En tilapia se ha demostrado por PCR la expresión de dos variantes de “splicing” que se diferencian en la falta o presencia de 20 residuos en la región correspondiente al dominio de unión a azúcares (Li et al., 2003). Consistentemente a estos descubrimientos, nuestros datos demuestran la presencia en ovarios de lenguado de dos isoformas de *vtgr* con gran similitud de secuencia a los VLDLR humanos y al VtgR/LR8 de pollo, una que contiene el dominio de unión a azúcares y la otra que no. En ovarios, encontramos mayor proporción de la forma más corta, detectándose también en hígado, riñón, músculo y testículo, mientras que la variante más larga se encontró de manera significativa en corazón y tejido adiposo. Los bajos niveles de ambas variantes de “splicing” en tejidos extra-ováricos contribuiría a la acción de las VLDL, una clase de lipoproteínas que incluyen las apolipoproteínas (apo) B en peces teleósteos, de manera similar a lo que ocurre en tetrápodos (Babin, 1987; Babin y Vernier, 1989), y presentes en elevadas concentraciones en plasma de trucha arco iris durante los estadios de previtelogénesis y vitelogénesis (Wallaert y Babin, 1994). Las propiedades de unión de las repeticiones LA del VtgR de tilapia fueron testadas por un sistema semicuantitativo de dos híbridos de levadura por interacción proteína-proteína, que reveló las propiedades críticas de las tres primeras repeticiones LA del dominio de unión a Vtg, las cuales contienen motivos de unión homólogos a los motivos de unión de las apoB-100 y apoE de mamíferos (Li et al., 2003). Se supone que

estos clusters LA participan en la unión de lipoproteína(s) vía residuos de carga positiva sobre apoB-100 o apoE (Jeon y Blacklow, 2005). La falta del dominio de unión a azúcares no parece afectar a la unión entre este receptor y sus ligandos (Li et al., 2003). Este dominio de unión a azúcares también ha sido encontrado por homología de secuencia en apoB de peces teleósteos (Babin et al., 1995) y en apoE (Babin et al., 1999; Durliat et al., 2000; Poupard et al., 2000), esta última apolipoproteína no encontrada en pájaros (Schneider et al., 1999).

Los estudios de hibridación in situ realizados sobre secciones de ovario de lenguado senegalés mostraron un elevado nivel de transcripción de *vtgr* durante la previtelogénesis y los resultados obtenidos por qPCR demostraron una correlación positiva con el porcentaje de oocitos previtelogénicos. La expresión de  *$\beta$ actina* también mostró una correlación significativamente positiva con el porcentaje de oocitos previtelogénicos, imposibilitando así su uso como gen de referencia bajo estas condiciones. El almacenamiento de ARNm del *vtgr* en los nucleolos durante la previtelogénesis, la desaparición de la señal de hibridación en oocitos vitelogénicos y la correlación significativamente negativa entre los niveles de transcrito *vtgr* y el porcentaje de oocitos vitelogénicos indica, como previamente ya se sugirió en trucha arco iris (Perazzolo et al., 1999) y pollo (Shen et al., 1993), que el VtgR es traducido prioritariamente en los estadios tempranos del desarrollo oocitario y almacenado en el interior del citoplasma para ser gradualmente movilizado hacia la superficie tras la aparición de Vtg en plasma, p.e. durante la fase de crecimiento vitelogénico. Los bajos niveles de ARNm de *vtgr* al final de la foliologénesis fue verificada por los datos obtenidos por qPCR en la perca blanca (Hiramatsu et al., 2004) y por la falta de dicho transcrito en el transcriptoma de folículos ováricos en crecimiento finalizado del pez cebra

(Knoll-Gellida et al., 2006). Los datos obtenidos en el presente estudio también revelaron que los transcritos de *vtgr* no fueron detectados por hibridación in situ en folículos atrésicos, y que sus niveles, cuantificados por qPCR, no se correlacionaron con el porcentaje de atresia. Estos resultados indican que el nivel de transcritos de *vtgr* puede ser utilizado como marcador molecular del número de oocitos reclutados en vitelogénesis.

Se ha demostrado, que la atresia folicular en diferentes especies de vertebrados es un resultado de la muerte celular programada, proceso denominado apoptosis, iniciado entre la población de células de la granulosa (Kaipia y Hsueh, 1997; Morita et al., 1999) o también como resultado de apoptosis iniciada en el propio oocito (Morita et al., 1999; Eppig, 2001). También se ha demostrado que los oocitos de peces producen factores que modulan las funciones foliculares y que la proteólisis dirigida por enzimas lisosomales presentes en las proteínas del vitelo puede dirigir hacia la atresia folicular (Wang y Ge, 2003; Wood y Van Der Kraak, 2003) sin necesidad de una apoptosis folicular general (Wood y Van Der Kraak, 2003). Tal y como la atresia avanza, el contenido del vitelo de los folículos atrésicos es gradualmente digerido y re-absorbido, resultando en la formación de la corpora atretica y agregados primarios compuestos de pigmentos y lípidos oxidados (Saidapur, 1978; Guraya, 1986; Blazer, 2002). En la trucha arco iris (Babin, 1987) y en pollo (Walzem et al., 1994), se ha demostrado que a lo largo de la atresia folicular existe una transferencia masiva de algunas proteínas del vitelo, y posiblemente también de lípidos combinados con lipoproteínas de elevada densidad, hacia el corriente sanguíneo.

Las FABPs son un grupo de pequeñas proteínas citoplasmáticas (14-15 kDa) que pertenecen a la conservada superfamilia multigénica de las proteínas intracelulares de unión a lípidos (ILBPs). Junto con otras familias de

unión a proteínas, lipocalinas y avidinas, las FABPs forman parte de una superfamilia estructural: las calicinas (Flower, 1996). En vertebrados, al menos nueve FABPs diferentes han sido identificadas, con distribución específica de tejido (Storch y Thumser, 2000; Zimmerman y Veerkamp 2002; Haunerland y Spener, 2004; Chmurzynska, 2006) y con distintos patrones de interacción entre ellas (Richieri et al., 2000, Hanhoff et al., 2002). Generalmente se las denomina como el tejido donde se las caracterizó por primera vez, sin embargo, su expresión no es exclusiva, y más de una FABP puede ser encontrada en un determinado tejido o tipo celular, con lo cual se ha establecido una nomenclatura numérica para distinguir los diferentes genes que codifican FABPs (Hertzel y Bernlohr, 2000). Últimamente se ha caracterizado un miembro más (FABP10) en especies no mamíferas, incluyendo peces teleósteos (Haunerland y Spener, 2004; Sharma et al., 2006). Todas las subfamilias de proteínas FABP encontradas en peces teleósteos corresponden a subfamilias humanas, con la excepción de una única subfamilia de FABP, agrupada en un grupo hermano de FABP4/FABP5/FABP8/FABP9 en tetrápodos, y se ha encontrado sólo en peces teleósteos, la hemos denominado FABP11. La proteína FABP11 de *Solea senegalensis* caracterizada en este trabajo es parte de esta nueva subfamilia definida como FABP11.

Las FABPs se expresan en tejidos de vertebrados y en no vertebrados, con diferentes patrones de expresión (Zimmerman y Veerkamp 2002; Esteves y Ehrlich 2006). La función principal de todos los miembros FABP, es regular la toma y el transporte intracelular de AG. Otras de las funciones conocidas son: señalar los AG para sus respectivas rutas metabólicas y regular la expresión génica y el crecimiento celular (Zimmerman y Veerkamp 2002; Haunerland y Spener, 2004). Los ovarios de rata expresan FABP3 y FABP2, tal y como se ha demostrado por localización inmunohistoquímica

en células intersticiales de la teca interna (Watanabe et al., 1991), en células somáticas durante el desarrollo post-natal y en ovarios inmaduros tratados con gonadotropinas (Iseki et al., 1995). En estas especies, la expresión de *fabp3* resultó regulada negativamente y la expresión de *fabp5* regulada positivamente en las células de la teca de ovario de rata tras la administración de la gonadotropina coriónica humana (Leo et al., 2001). Estudios de inmunodetección llevados a cabo en ovarios de ratón revelaron la presencia de FABP3 en glándulas intersticiales y en células de la teca (Nourani et al., 2005a), FABP4 en las células de la granulosa de folículos atrésicos (Nourani et al., 2005b) y FABP5 en una población específica de macrófagos ováricos en folículos en avanzado estado de atresia (Nourani et al., 2005a).

Se ha demostrado que el ARNm de *fabp3* del pez cebra es abundante y exclusivo del ooplasma de oocitos previtelogénicos (Liu et al., 2003), mientras que bajos niveles de este transcrito fueron detectados en el transcriptoma de folículos ováricos ya totalmente crecidos (Knoll-Gellida et al., 2006). El transcrito *fabp11* de lenguado se expresó mucho en ovario, hígado y tejido adiposo, y en menor grado en corazón, músculo, riñón y testículos. El análisis de hibridación in situ demostró que el transcrito *fabp11* de lenguado se expresaba en oocitos previtelogénicos, mientras que no se encontró señal de hibridación en los oocitos vitelogénicos de mayor tamaño. Sin embargo, contrariamente a la expresión del ARNm de *vtgr*, una fuerte expresión del transcrito *fabp11* se detectó en las capas somáticas de los folículos atrésicos. Más aún, se demostró por qPCR una correlación significativamente positiva entre el nivel de transcripción de *fabp11* y el porcentaje de atresia en muestras de ovario. Este elevado nivel de expresión ha sido identificado en células de la granulosa y/o de la teca hipertrofiadas durante la fragmentación oocitaria, la invasión folicular del espacio ocupado por el oocito, la elimina-



ción de orgánulos celulares y la degeneración de los folículos atrésicos. Estas células deben poseer también elevado contenido de proteínas celulares de unión al ácido nucleico, tal y como se ha demostrado en folículos degenerados y atrésicos de ovario de pez cebra (Liu y Giu, 2005). Durante el proceso de la atresia folicular en ratón, las células invasivas de la granulosa encontradas entre la zona pellucida y el oocito, parecen tener función fagocítica (Kamo et al., 2004). Más estudios son necesarios para determinar la naturaleza y origen de la invasión y proliferación de las células que expresan *fabp11* en los folículos atrésicos de lenguado. En el ovario de vertebrados, parecen existir distintas funciones para los diferentes subtipos de FABP relacionados con los cambios en la toma eficiente, transporte intra-celular y utilización de los AG acompañando la foliculogénesis, el proceso de atresia y la síntesis de hormonas.

En conclusión, en este trabajo mostramos que la cuantificación de los transcritos de *vtgr* y *fabp11* por qPCR puede permitir, a través de un análisis de regresión lineal, determinar el porcentaje de oocitos reclutados para la vitelogénesis y de aquellos camino de la atresia respectivamente. Estos marcadores pueden sin duda alguna, ayudar a identificar los factores envueltos en la regulación del crecimiento folicular y la degeneración del ovario de peces teleósteos, ayudando a mejorar las condiciones en cautividad para reducir al mínimo el stress que lleva a las hembras a la atresia, así como mejorar el conocimiento de la biología de la reproducción de los stocks de reproductores en cautividad.

**3.**

**Estudio del proceso de vitelogénesis en el  
lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)  
durante el ciclo reproductor**



### 3.1. Introducción

La vitelogenina (Vtg) de teleósteos y anfibios es una glicolipofosfoproteína de elevado peso molecular (250-600 kDa) que es sintetizada en el hígado en respuesta a  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) (revisado por Specker y Sullivan, 1994). La Vtg es secretada al corriente sanguíneo, de donde es captada por los oocitos en crecimiento mediante un proceso de endocitosis mediada por el receptor de la vitelogenina (VtgR), del que ya se ha hablado en el Capítulo 2. Tras ser procesada en el oocito por la acción de diversas proteasas, entre las cuales se encuentra la catepsina D, la Vtg da lugar a las proteínas del vitelo que son almacenadas en el oocito como fuente energética y nutritiva para el posterior desarrollo embrionario (Tyler et al., 2000). Este proceso, conocido como vitelogénesis, es el principal causante del crecimiento del oocito.

La Vtg está codificada por una pequeña familia multigénica que comprende entre uno y seis genes distintos (Wahli, 1988). Al menos tres de estos genes se transcriben y traducen fisiológicamente dando lugar a tres moléculas distintas (Vtg1, Vtg2 y Vtg3) las cuales son secretadas al torrente sanguíneo y son incorporadas por el oocito. La estructura primaria de Vtg1 y Vtg2 es idéntica y puede dividirse en una serie de dominios localizados de forma lineal en la secuencia: NH<sub>2</sub>-cadena pesada de lipovitelina (LvH)-

---

**Abreviaturas:** ANOVA, análisis de varianza; BSA, albúmina de suero bovino; CV, coeficiente de variación; DO, densidad óptica; DTT, ditioneitol;  $E_2$ ,  $17\beta$ -estradiol; ELISA, "Enzyme-linked Immunosorbent Assay"; FSH, hormona estimulante del folículo ovárico; IGS: índice gonadosomático; kDa, Kilo Dalton; PBS, solución fosfato; q-PCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; SDS-PAGE, electroforesis en gel de sodio dodecil sulfato-poliacrilamida; SEM, error estándar de la media; T, testosterona; TIU, unidades inhibitoras de tripsina; Vtg, vitelogenina; VtgR, receptor de Vtg.

fosvitina (dominio poliserina)-cadena ligera de lipovitulina (LvL)-componente b'-COOH (Mosconi et al., 1998). La Vtg3 posee los mismos dominios, excepto el dominio poliserina. La región aminoacídica cercana al C terminal de la Vtg, el componente b', recibió este nombre a partir de los primeros estudios cromatográficos que se realizaron en teleósteos. Cada uno de los dominios de Vtg corresponde a las diferentes proteínas del vitelo, lipovitelinas (lipoproteínas), fosvitinas y fosvetas (proteínas muy fosforiladas) y el componente b' (Matsubara et al., 1999; Hiramatsu et al., 2002ab). En especies de teleósteos marinos, las proteínas del vitelo son procesadas de forma distinta durante la maduración del oocito, lo que incrementa la concentración en aminoácidos libres en el oocito facilitando de este modo la hidratación de este.

Aunque Vtg es una proteína específica de hembras, los machos también poseen el gen(es) *vtg*, aunque este no se expresa normalmente debido a la falta de niveles circulantes adecuados de E<sub>2</sub> (Harries et al., 1997). Sin embargo, en respuesta al tratamiento con estrógenos (Yao y Crim, 1996), o debido a la presencia de compuestos con actividad estrogénica en el medio acuático (Harries et al., 1997; Metcalfe et al., 2001), Vtg puede ser producida por machos y acumulada en el plasma incluso en concentraciones muy elevadas.

En general, el E<sub>2</sub> es considerado el estrógeno endógeno más potente. Bajo la influencia de las hormonas gonadotropinas, muy probablemente la hormona estimulante del folículo (FSH), las células somáticas asociadas con el oocito sintetizan testosterona (T), que es convertida a E<sub>2</sub> por la acción de la enzima aromatasa (Nagahama et al., 1995). El E<sub>2</sub> pasa al corriente sanguíneo estimulando la síntesis y secreción de Vtg en el hígado. Por tanto, los

niveles plasmáticos de  $E_2$  se observan a menudo correlacionados con los niveles plasmáticos de Vtg.

Actualmente, se conoce muy poco sobre el control endocrino de la reproducción en cautividad del género *Solea*, especialmente sobre el proceso de vitelogénesis. Las variaciones estacionales de los niveles plasmáticos de  $E_2$  a lo largo del ciclo reproductivo del lenguado senegalés han sido recientemente descritas en individuos en cautividad y salvajes (García et al., 2006ac). Sin embargo, no se ha establecido la posible relación entre los niveles circulantes de  $E_2$ , Vtg y su receptor específico (VtgR) a lo largo del desarrollo gonadal. Por ello, en este capítulo se ha investigado de una forma global los principales mecanismos fisiológicos implicados en la vitelogénesis del lenguado. Los objetivos específicos han sido: 1) determinar los niveles plasmáticos de  $E_2$  y Vtg en hembras de lenguado a lo largo del ciclo reproductor en cautividad; y 2) estudiar los cambios en los niveles de expresión de VtgR a lo largo de los diferentes estadios de vitelogénesis.

## **3.2. Material y métodos**

### **3.2.1. Animales**

El presente estudio se realizó a partir de los mismos individuos adultos de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) generación F1 utilizados en el Capítulo 2, de aproximadamente 2-3 años de edad, muestreados durante tres años consecutivos. De tres a cinco hembras fueron anestesiadas aproximadamente cada mes con 500ppm de 2-fenoxietanol (Acros Organics, USA) y una muestra de sangre (1 ml) extraída. Esta muestra se mezcló con un inhibidor de proteasas (2 mM de fenilmetilsulfonil fluoride, PMSF, Sigma-

Aldrich, España), se centrifugó, y el plasma fue congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis. Las hembras fueron seguidamente sacrificadas y los índices gonadosomáticos (IGS: peso gonadal/peso corporal x 100) registrados. Se recogieron pequeñas piezas de ovario en condiciones libres de ribonucleasas, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción de ARN. Finalmente, se fijó una pieza de gónada adyacente a las piezas tomadas para la extracción de ARN en solución modificada de Bouin (75% ácido pícrico, 25% formalina). Estas muestras se procesaron y se realizó el análisis histológico tal y como se describe en el Capítulo 2.

### 3.2.2. Obtención y purificación de Vtg de lenguado

Para la producción de cantidades elevadas de Vtg, machos de lenguado fueron inyectados con 50 mg/ml  $\text{E}_2$  siguiendo el protocolo descrito por Scott et al. (2006). Brevemente, el  $\text{E}_2$  en polvo fue derretido en mantequilla de coco (Sigma-Aldrich) a  $40^{\circ}\text{C}$  por ultrasonificación, y 20 mg/kg de pez fueron inyectados intramuscularmente en 2-3 machos previa anestesia con 500 ppm de 2-fenoxietanol. Los machos fueron tratados una vez por semana durante dos semanas consecutivas y sangrados durante la tercera semana por la vena caudal. Para evitar cualquier degradación de la Vtg, las jeringas de 1 ml utilizadas para el sangrado fueron lavadas en una solución salina conteniendo aprotinina, 8 unidades inhibitoras de tripsina (TIU)/ml (Sigma-Aldrich), y 500 unidades internacionales (UI)/ml de heparina sodio (para evitar la coagulación). La sangre fue transferida a tubos eppendorf en hielo, los cuales contenían 100  $\mu\text{l}$  a una concentración 10x de la solución Complete, Mini, EDTA-free Proteasa Inhibitor Cocktail (Roche, Alemania), por cada 900  $\mu\text{l}$  de sangre. Tras centrifugar a 12.000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$  durante 15

min, el plasma fue transferido a nuevos tubos, congelado en nitrógeno líquido y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

La Vtg fue purificada por cromatografía en columna Sephadex 200HR (GE Healthcare, España) asociada a un sistema FPLC (GE Healthcare) basándonos en el protocolo descrito por Scott y Hylland (2002) para la Vtg del lenguado inglés. Antes de añadir la muestra, la columna fue equilibrada con 50 mM Tris-HCl a pH 7,6 conteniendo 0,01% de azida de sodio. El plasma fue descongelado en hielo, centrifugado a 13.000 rpm durante 4 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , y 650  $\mu\text{l}$  del sobrenadante trasvasado a un tubo de vidrio de 10 ml al que después se añadió 97  $\mu\text{l}$  de 0,5 M  $\text{MgCl}_2$ , 1.950  $\mu\text{l}$  de 20 mM EDTA a pH 7,6, y 9.750  $\mu\text{l}$  de agua muy fría. Después de centrifugar el tubo a 3.000 rpm durante 12 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 390  $\mu\text{l}$  de solución de equilibrado + 1 mM de NaCl y 0,2 TIU/ml de aprotinina, y se añadieron lentamente 13 ml de solución de equilibrado + 0,2 TIU/ml de aprotinina (esta vez sin NaCl), siendo todo este volumen inyectado en la columna a una velocidad de 2,5 ml/min y 2,5 ml/fracción. El protocolo se llevó a cabo a temperatura ambiente. Aparecieron varios picos pequeños y uno muy dominante. Se recogieron sólo las fracciones correspondientes a este pico. El procedimiento se repitió de nuevo, y las fracciones finales combinadas se desalaron en columna PD-10 (GE Healthcare) con agua destilada y se liofilizaron.

El peso molecular y la pureza de la Vtg fueron verificados por electroforesis en gel de sodio dodecil sulfato-poliacrilamida (SDS-PAGE). Finalmente, la Vtg purificada fue liofilizada y almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



3.2.3. Desarrollo de un ELISA homólogo para la detección de Vtg plasmática en el lenguado

3.2.3.1. SDS-PAGE

El peso y la pureza de la Vtg purificada fueron verificados por SDS-PAGE. Para ello, plasma de hembras vitelogénicas y de machos tratados con mantequilla de coco con o sin E<sub>2</sub>, así como diluciones seriadas de la Vtg purificada (desde 0,1 a 20 µg), fueron separadas por electroforesis, las muestras de plasma centrifugadas a 13.000 rpm a 4°C durante 1 min, y 1 µl de plasma, en el caso de la hembra y el macho control, ó 1 µl de la dilución 1/10, en el caso de los machos tratados con E<sub>2</sub>, fueron mezcladas con solución Laemmli 2x (Laemmli, 1970) y 0,1 M del agente reductor ditioneitol (DTT). La Vtg liofilizada fue reconstituida en solución fosfato (PBS) + inhibidores de proteasas (Mini, EDTA-free Proteasa Inhibitor Cocktail, Roche) y mezclada con solución Laemmli 2x y DTT. Tras desnaturalizar las proteínas durante 3 min a 95°C las muestras fueron separadas a 180 v en geles al 7,5% y teñidos con Coomassie blue R-350 (GE Healthcare) durante toda la noche a temperatura ambiente.

3.2.3.2. Procedimiento de ELISA

El procedimiento de ELISA empleado para determinar los niveles plasmáticos de Vtg en el lenguado senegalés se inspiró en el protocolo descrito anteriormente por Katsiadaki et al. (2002), con algunas modificaciones. El “coating” se realizó en placas de alta unión a proteínas de 96 pocillos de poliestireno (Costar® EIA/Corning, España) en 100 µl de solución 0,05 M de sodio carbonato-bicarbonato a pH 9,6 (Sigma) conteniendo 0,5 µg/ml de Vtg de lenguado (50 ng/pocillo). Los valores para el blanco y los sitios de

unión no específica (N) se obtuvieron realizando el “coating” de algunos pocillos con la misma concentración de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich) en lugar de Vtg. Las placas se cubrieron y se incubaron a 4°C durante 16 h.

El mismo día y por separado, en placas de baja unión a proteínas de 96 pocillos de polipropileno (Costar® EIA/Corning), se añadieron 135 µl de solución de ensayo (sodio-fosfato 0,1 M; 0,15 M de NaCl; 27 mM de KCl; 0,05% Tween 20; 0,1% de BSA y 0,15 mM de azida de sodio, a pH 7,8) en todos los pocillos, y se añadió 15 µl de cada muestra y de cada estándar (desde 1 mg/ml a 124 ng/ml) por duplicado. En los pocillos correspondientes a los valores del blanco, los sitios de unión no específica (N) y el máximo de unión (Bo) se añadieron 15 µl de solución de ensayo. Se añadió entonces a todos los pocillos, 65 µl del anticuerpo comercial específico anti-Vtg de lenguado senegalés (Agrisera, Suecia) diluido 1/25.000 en solución de ensayo (dilución final por pocillo de 1/75.000), excepto a los pocillos correspondientes al blanco, a los cuales se añadió el mismo volumen de solución de ensayo. Las placas fueron incubadas durante 16 h a 4°C.

En la mañana del segundo día, el contenido de las placas de alta unión a proteínas fue eliminado por inversión y éstas fueron lavadas tres veces con solución sodio-fosfato 0,1 M a pH 7,8, 0,15 M de NaCl, 27 mM de KCl, 0,05% Tween 20 (PBS-T). La saturación de los sitios de unión no específicos se llevó a cabo incubando las placas en PBS-T + 2% BSA durante treinta minutos a 37°C, y lavadas de nuevo tres veces con PBS-T. Seguidamente, 150 µl del contenido de cada pocillo de la placa de baja unión a proteínas fue traspasado a su correspondiente pocillo en la placa de alta unión a proteínas, y se incubó durante 16h a 4°C en agitación.

Durante la mañana del tercer día, las placas se lavaron de nuevo tres veces con PBS-T, se añadió a cada pocillo 150 µl del anticuerpo secundario (HRP-labelled Goat anti-rabbit IgG, BioRad Laboratories, CA) a una dilución 1/2.000 en solución de ensayo (excepto a los pocillos correspondientes al blanco a los cuales se añadió el mismo volumen pero sólo de solución de ensayo), y se dejó incubar durante 1h a 37°C. Las placas se lavaron de nuevo, esta vez con agua, y se añadieron 100 µl/por pocillo de substrato TMB (TMB peroxidase substrate kit, BioRad Laboratories), preparado según instrucciones del fabricante, a temperatura ambiente hasta que la reacción fue completada (aprox. 25 min) y entonces fue parada con 100 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a concentración 1M. La densidad óptica (DO) fue medida en un espectrofotómetro (SynergyHT-I, España) a 450 nm.

Los resultados de las absorbancias obtenidas fueron transformados para obtener una ecuación lineal según:  $y = a + bx$ , donde  $y = \ln \left( \frac{B_i - N}{B_0 - B_i} \right)$ ; donde  $B_i$  representa la unión de cada punto,  $B_0$  el máximo número de uniones específicas y  $N$  el número de uniones no específicas; siendo  $a$  y  $b$  constantes. La linealidad de las curvas estándar fue estudiada mediante análisis de covarianza usando test-F. La sensibilidad del ELISA fue determinada mediante 10 diluciones seriadas de plasma de macho tratado con E<sub>2</sub>, plasma de macho no tratado con E<sub>2</sub> (macho control) y Vtg purificada (desde 10,5 a 2,4 ng/pocillo).

#### 3.2.4. Análisis de esteroides

Los niveles plasmáticos de E<sub>2</sub> fueron cuantificados por la técnica de ELISA siguiendo el método descrito en Rodríguez et al. (2000). Los esteroides libres fueron extraídos a partir de 3,5 µl de plasma en 1 ml de metanol. Los estándares para E<sub>2</sub>, el anticuerpo específico de conejo contra E<sub>2</sub>, el anti-

cuerpo monoclonal IgG de ratón anti-conejo y el trazador enzimático E<sub>2</sub> acetilcolinesterasa conjugado (E<sub>2</sub>-AChE) fueron obtenidos de Cayman Chemical Company (Michigan, USA). Las placas de 96 pocillos (MaxiSorp™) fueron obtenidas de Nalgene Nunc Internacional (Rochester, USA). Se estableció una curva estándar de  $6,1 \times 10^{-4}$  a 2,5 ng/ml para cada ensayo. Estándares y muestras fueron medidos por duplicado.

#### 3.2.5. RT-PCR cuantitativa en tiempo real

La expresión del *vtgr* en ovarios en distinto estado de vitelogénesis fue evaluado por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR). Se extrajo el ARN total del ovario de 16 hembras en diferentes épocas del año con diferentes IGS y porcentajes de vitelogénesis. Los métodos empleados fueron los mismos a los descritos en el Capítulo 2.

#### 3.2.6. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Los niveles plasmáticos de E<sub>2</sub>, Vtg, así como los IGS fueron estadísticamente analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de un factor, seguido por el test de comparación de medias de Tukey. Los datos obtenidos por qPCR fueron analizados por regresión lineal y correlacionados por el test de Spearman Rank Order. Se utilizó los software SigmaPlot 9.0 y SigmaStat 3.1 (Systat Software, USA). El nivel de significancia se estableció en  $P < 0,05$ .

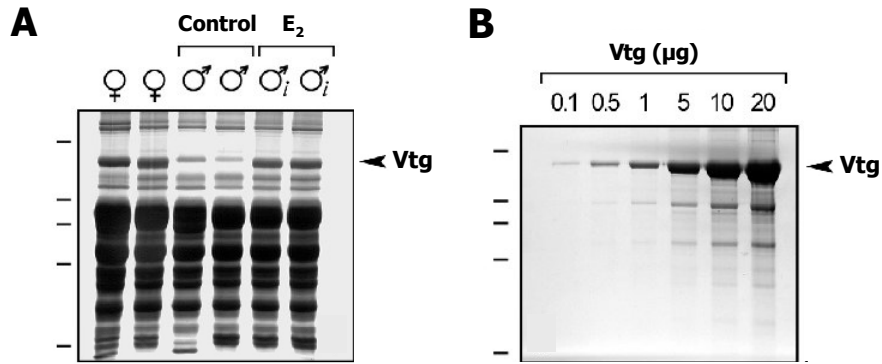
### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Validación de un ELISA para la detección de la Vtg del lenguado senegalés

El peso y la pureza de la Vtg purificada fue investigada mediante SDS-PAGE (Fig. 3.1.). En la Figura 3.1.A se muestra plasma de dos hembras en estado vitelogénico, dos machos controles tratados con mantequilla de coco sin E<sub>2</sub>, y dos machos tratados con mantequilla de coco con E<sub>2</sub>. La tinción Coomassie reveló la presencia de numerosas bandas correspondientes a distintas proteínas plasmáticas de masa molecular (en kDa) variable. El análisis por SDS-PAGE de diluciones seriadas de Vtg desde 0,1µg hasta 20 µg, (Fig. 3.1.B) reveló la presencia de tres polipéptidos con distinta masa molecular, que fueron visibles a partir de la concentración de 1 µg, posiblemente debido a la fragmentación de la Vtg purificada durante el proceso de purificación.

Para el ensayo, la concentración de Vtg fijada para realizar el “coating” fue establecida en 50 ng/pocillo, y la dilución final del anticuerpo específico en 1/75.000, valores aconsejados por el fabricante. Estas condiciones de trabajo ofrecían un máximo valor de absorbancia próximo a 1,7 tras finalizar la reacción (datos no mostrados); rango en el cual nuestro lector de placas ofrece respuestas lineales de DO.

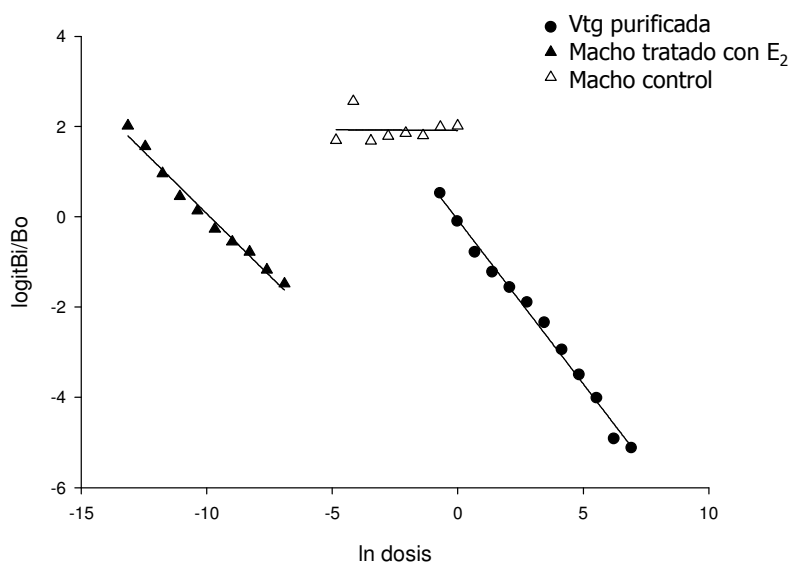
El límite de detección al 90 % de unión, ED<sub>90</sub>, fue aproximadamente 1,72 ng/pocillo (171,69 ng/ml), el coeficiente de variación (CV) inter-ensayo al 50 % de unión fue de 1,44±0,69 % (n= 2), y el CV intra-ensayo (calculado a partir del duplicado de las muestras) fue 4,27±1,88 % (n = 2).



**Fig. 3.1.** A. Separación de proteínas plasmáticas por SDS-PAGE seguida de tinción Coomassie blue. Se indican hembras en estado vitelogénico, machos control y machos inyectados con E<sub>2</sub>. B. Análisis por SDS-PAGE de diluciones seriadas de Vtg de lenguado purificada por cromatografía en columna. Los marcadores de masa molecular, de mayor a menor, son: 205, 116, 97, 66 y 45 kDa.

El paralelismo entre ambas curvas estándar fue analizado por análisis de covarianza usando el test F, no detectándose diferencias estadísticas entre las curvas de regresión ( $P_{\text{obs}} = 0,146 \ll P_{0,05} = 0,885$ , con 22 grados de libertad).

Los datos correspondientes a las curvas de regresión de varios antígenos, se pueden observar en la Fig. 3.2, donde se muestra 10 diluciones seriadas de nuestra Vtg purificada de lenguado (desde 10,5 a 2,4 ng/pocillo); macho tratado con E<sub>2</sub> y macho no tratado. El paralelismo entre estas curvas fue de nuevo estudiado por análisis de covarianza usando el test-F, no encontrándose diferencias estadísticas significativas entre las diferentes regresiones lineales ( $F_{\text{obs}} = -3,60 \ll F_{0,05} = 0,002$ , con 23 grados de libertad).



**Fig. 3.2.** Curvas de regresión ( $\log(\text{dosis}) = \ln \left( \frac{B_i - N}{B_0 - B_i} \right)$ ) obtenidas a partir de los siguientes antígenos: macho tratado con E<sub>2</sub> (▲):  $y = -5,42 - 0,55x$ ;  $R^2 = 0,9834$ ; macho control (△):  $y = 1,91 - 0,00x$ ;  $R^2 = 0,9813$ ; y Vtg de lenguado senegalés purificada por cromatografía en columna y liofilizada (●):  $y = -0,07 - 0,73x$ ;  $R^2 = 0,9970$ .

### 3.3.2. Perfil estacional de estrógenos y vitelogenina en plasma

Para determinar las variaciones en las concentraciones de E<sub>2</sub> y Vtg plasmáticas durante la vitelogénesis del lenguado se analizaron muestras de plasma de 44 hembras en diferentes estadios de desarrollo gonadal durante 3 ciclos reproductivos consecutivos. Estos análisis indicaron que los niveles de E<sub>2</sub> son bajos desde agosto hasta enero (Fig. 3.3.A), siendo noviembre el mes con niveles más bajos ( $0,44 \pm 0,15$  ng/ml). En los meses de febrero y marzo los niveles de E<sub>2</sub> son los más elevados de todo el año, observándose el pico ( $6,19 \pm 1,50$  ng/ml) en febrero ( $P < 0,05$ ).

La concentración de Vtg plasmática alcanzó su máximo nivel durante el mes de febrero ( $438,58 \pm 82,27 \mu\text{g/ml}$ ), y se mantuvo elevada hasta mayo, bajando su concentración drásticamente en el mes de julio ( $31,21 \pm 4,38 \mu\text{g/ml}$ ), y manteniéndose relativamente baja hasta el mes de enero (Fig. 3.3.B).

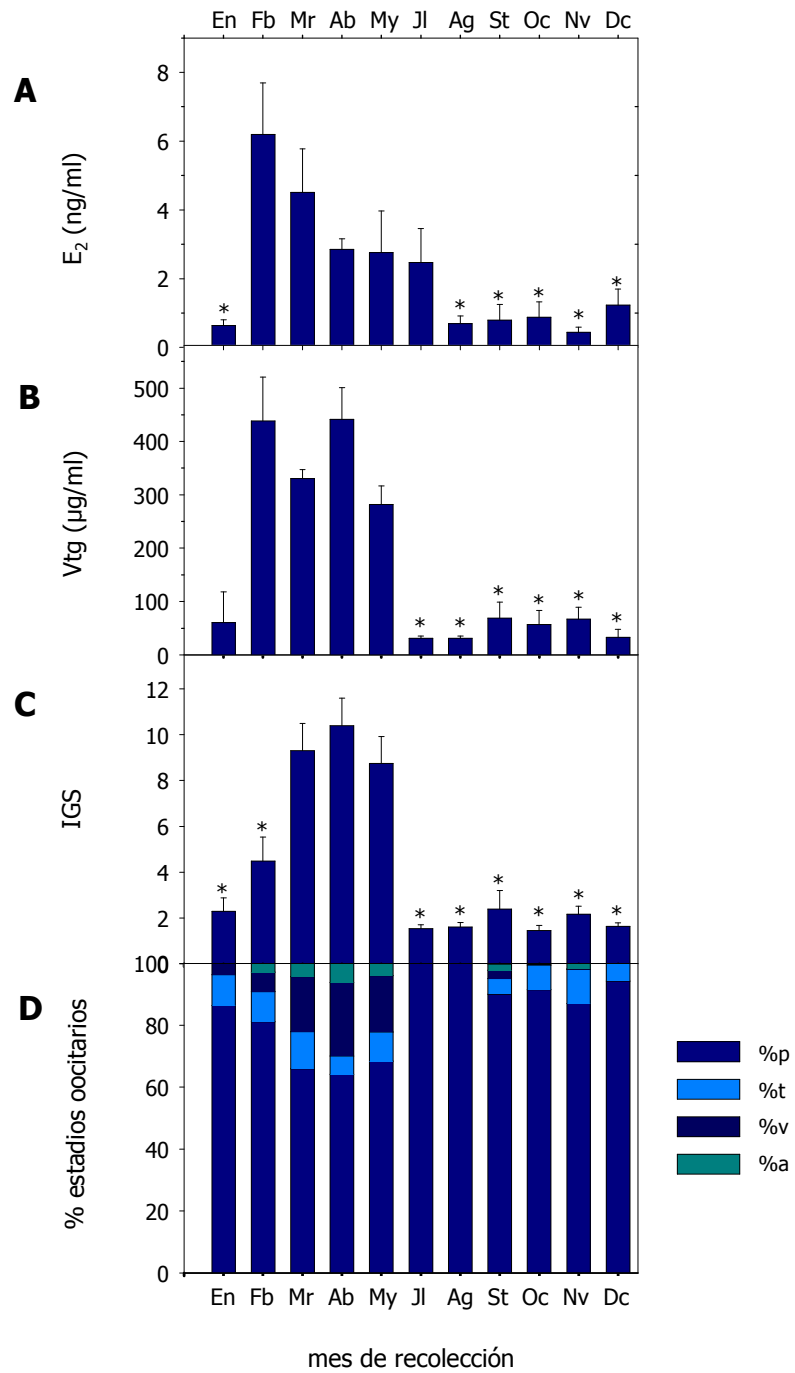
Los niveles de IGS (Fig. 3.3.C), resultaron elevados ( $P < 0,05$ ; entre 8,8 y 10,4) de marzo a mayo, coincidiendo con los meses de mayor concentración de Vtg plasmática, y manteniéndose relativamente bajos ( $< 2,5$ ) durante el resto del año.

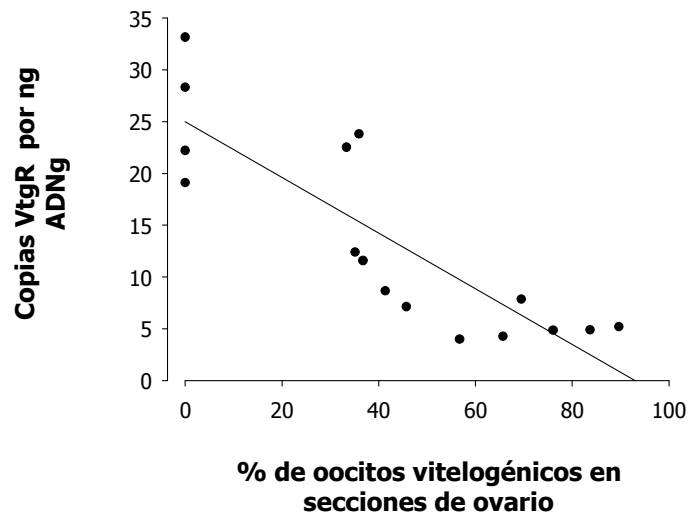
El análisis histológico reveló (Fig. 3.3.D) que en el ovario de lenguado senegalés existen oocitos previtelogénicos durante todo el año (siendo el 100% de los oocitos estrictamente previtelogénicos durante los meses de julio y agosto). En el resto de meses, siempre encontramos un cierto porcentaje de oocitos en vitelogénesis temprana, mientras que el porcentaje de oocitos vitelogénicos y atrésicos en el ovario resultó variable durante los meses de enero a mayo, y desde septiembre a noviembre.

---

**Fig. 3.3.** Concentraciones de  $E_2$  (A), y Vtg (B) en plasma, así como variaciones del IGS (C) y porcentaje de oocitos en diferentes estadios de desarrollo en el ovario (D), durante el ciclo reproductor de hembras de lenguado senegalés. Oocitos previtelogénicos (p), oocitos en vitelogénesis temprana (t), oocitos vitelogénicos (v), y oocitos en atresia (a).







**Fig. 3.4.** Regresión lineal simple entre el número de copias de los transcritos de *vtgr* normalizados por ADN genómico (eje Y) y el porcentaje de folículos ováricos vitelogénicos en secciones histológicas de ovario de 16 hembras sacrificadas en 3 ciclos reproductivos consecutivos (eje X). Coeficiente de correlación ( $r$ ) y P valor ( $P$ ) determinados por Spearman Rank Order usando el software SigmaStat y SigmaPlot:  $y = 25,00 - 0,27x$   $R^2 = 0,7246$ ;  $P = 0,000$ ;  $r = -0,847$ .

### 3.3.3. Expresión de *vtgr* durante la vitelogénesis evaluada por qPCR

El análisis de los resultados obtenidos por qPCR a partir de 16 muestras de ovario en diferentes estados de vitelogénesis mostró elevados niveles del transcrito *vtgr* en ovarios previtelogénicos con un 0% de oocitos vitelogénicos. La acumulación de *vtgr* decreció significativamente a medida que aumentaba el porcentaje de folículos vitelogénicos (Fig. 3.4.). Estos resultados por tanto indican que la expresión del ARN de *vtgr* en el oocito disminuye a medida que este avanza en su crecimiento.

### 3.4. Discusión

El ELISA llevado a cabo en este trabajo permite determinar la concentración de Vtg en el plasma del lenguado senegalés. El anticuerpo comercial empleado no reacciona con ninguna otra proteína en el plasma del lenguado. El paralelismo mostrado por las diluciones seriadas de plasma de macho tratado con E<sub>2</sub> y de Vtg purificada, sugiere que el anticuerpo reconoce ambos antígenos de igual forma (Fig. 3.2.). Los CV intra e inter-ensayo son inferiores al 10%, concretamente 1,44±0,69% y 4,27±1,88% respectivamente, así como el límite de sensibilidad al 90% (1,72 ng/pocillo, 171,69 ng/ml), muestran valores un poco elevados, pero similares a los obtenidos por otros autores (Núñez et al., 1989; Mañanos et al., 1994; Kishida et al., 1992; Lomax et al., 1998; Schafhauser y Benfey, 2002; Katsiadaki et al., 2002; Scott et al., 2006). En *Solea solea*, la sensibilidad resultó de 2,5 ng/ml y los CV intra e inter-ensayo del 4,5 y 7,5 % respectivamente (Núñez et al., 1989); en *Morone saxatilis* (Kishida et al., 1992) el límite de sensibilidad fue de 160 ng/ml y los CV intra e inter-ensayo de 13% y 14% respectivamente. En el lenguado inglés (*Pleuronectes vetulus*), la sensibilidad al 50% de unión fue de 80 ng/ml y los CV intra e inter-ensayo de 6,8% y 9,6% respectivamente (Lomax et al., 1998). En la trucha (*Salvelinus fontinalis*), la sensibilidad al 85% y 15% fue de 12-375 ng/ml, con unos CV intra e inter-ensayo de 3,9% y 14,7% respectivamente (Schafhauser y Benfey, 2002). En el bacalao (*Gadus morhua*), los CV intra-ensayo variaron desde 11,9% a 13,4% y los CV inter-ensayo de 11,5% a 37,2% (Scott et al., 2006).

Los niveles plasmáticos de Vtg se determinaron en hembras de lenguado F1 en condiciones naturales de temperatura y fotoperiodo. Los datos indican que los niveles circulantes de Vtg se elevan significativamente unos

tres meses antes del periodo de puesta, concretamente en febrero cuando se observan los valores más altos de Vtg en plasma ( $438,58 \pm 82,27 \mu\text{g/ml}$ ), y se mantienen elevados durante toda la temporada de puesta, disminuyendo significativamente en el mes de julio (Fig. 3.3.B). Los datos obtenidos en el lenguado son similares a los observados en otras especies, como en *Salmo salar* (So et al., 1985), donde el nivel máximo fue observado tres meses antes del periodo de puesta, o los  $6 \text{ mg/ml}$  observados *Cynoscion nebulosus* (Copeland y Thomas, 1988) justo antes de la puesta. Sin embargo, son un poco inferiores a los descritos en *S. solea* (Núñez et al., 1989), donde el máximo nivel de Vtg encontrado en plasma fue de aproximadamente  $3 \text{ mg/ml}$  al menos tres meses antes de la primera puesta (con tres o más sucesivas ovulaciones por hembra). Probablemente, estas diferencias entre ambas especies de peces planos tan próximas entre sí se deban a diferentes estrategias reproductivas, ya que como es sabido, el lenguado común realiza sus puestas en invierno (Ramos, 1982) mientras que la puesta del lenguado senegalés ocurre en primavera y otoño (Anguis y Cañavate, 2005).

En cuanto a los niveles plasmáticos de  $E_2$ , éstos fueron similares a los valores obtenidos en otros teleósteos en cautividad (p.e. Sol et al., 1998; Mandich et al., 2004), así como a los descritos anteriormente para el lenguado senegalés en stocks salvajes y F1 (García-López et al., 2006ac). La concentración máxima de  $E_2$  en plasma es de  $6,56 \pm 2,52 \text{ ng/ml}$  aproximadamente entre dos y tres meses antes del periodo de puesta. Durante el verano, periodo en el que los valores de IGS son los más bajos (Fig. 3.3.C) y en el ovario predominan los oocitos previtelogénicos (Fig. 3.3.D), los niveles de  $E_2$  en plasma son bajos (Fig. 3.3.A). En septiembre hay un ligero incremento en la concentración plasmática de  $E_2$ , coincidiendo con la activación del crecimiento del oocito, como demuestra un suave aumento del IGS y la aparición de oocitos en vitelogénesis temprana. Ello puede ser

de oocitos en vitelogénesis temprana. Ello puede ser debido a la aparición de algunas puestas esporádicas durante el otoño y el invierno. El pico en los valores plasmáticos de  $E_2$  corresponde a febrero, mes en que aumenta la concentración de Vtg en plasma y que precede al incremento del IGS y el máximo de oocitos en vitelogénesis que ocurre en el mes de abril (Fig. 3.3.A-D), momento en que comienza la época natural de puesta del lenguado senegalés en el Mediterráneo (generalmente hasta junio; Arias y Drake, 1990; Cabral y Costa, 1999; Cabral, 2000) y en cautividad bajo regímenes de temperatura naturales (Dinis et al., 1999; Anguis y Cañavate, 2005).

Los niveles plasmáticos de Vtg son muy bajos desde julio hasta enero, coincidiendo con valores bajos de IGS y una reducida proporción de oocitos vitelogénicos en ovario (Fig. 3.3.B-D). Los valores de Vtg plasmática presentan un pico en el mes de febrero y se mantienen elevados hasta el mes de mayo (Fig. 3.3.B). Sin embargo, en el mes de julio disminuye drásticamente, al igual que los valores de IGS.

Es conocido que el patrón de puesta en hembras de *S. senegalensis* es de tipo grupo síncrono (Rodríguez, 1984). Según este modelo, en el interior del ovario existen oocitos que son continuamente reclutados para entrar en vitelogénesis, madurar y ovular a lo largo del periodo de puesta, con lo cual cada hembra es capaz de realizar un número elevado de pequeñas puestas durante un largo periodo de tiempo (varios meses). Esta característica también ha sido descrita en otras especies del género *Solea*, como *S. lascaris* (Risso; Deniel et al., 1989) y *S. solea* (Whitthames y Walker, 1995). Posiblemente por este hecho en este trabajo se ha encontrado un elevado porcentaje de oocitos en estado previtelogénico durante todo el año (Fig. 3.3.D). Durante la época de puesta se observan diferentes grados de desarrollo ooci-

tario, desde oocitos muy inmaduros hasta atresia folicular debida a la ausencia de maduración tras el proceso de vitelogénesis.

Como se ha descrito en el Capítulo 2, el nivel de expresión del transcrito *vtgr* en el ovario del lenguado es elevado cuando éste es inmaduro, con un máximo de expresión cuando el 100% de los oocitos se encuentran en estado previtelogénico (Fig. 2.7.A; pg. 81). Los datos presentados aquí indican que el nivel de expresión del *vtgr* en el ovario disminuye conforme aumenta el número de oocitos reclutados en vitelogénesis (Fig. 3.4.). Por tanto, este modelo en el lenguado senegalés es similar al descrito en otros tetrápodos y peces teleósteos (Bujo et al., 1995b; Davail et al., 1998; Perazzolo et al., 1999), donde la transcripción del gen *vtgr* parece ocurrir durante los estadios iniciales de desarrollo ovárico. De este modo, la transcripción de *vtgr* en el oocito ocurre antes de que el receptor sea necesario para la captación de la Vtg plasmática y el inicio del crecimiento ovocitario.



**4.**

**Inducción a la puesta en cautividad del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)**





#### 4.1. Introducción

Durante las últimas décadas, la acuicultura de peces marinos en el sur de Europa se ha concentrado en la dorada (*Sparus aurata*) y en la lubina (*Dicentrarchus labrax*). Como resultado, el mercado se ha saturado y los precios han disminuido, lo que demanda más esfuerzos científicos y tecnológicos para el desarrollo de nuevas especies de cultivo comercial. Entre las especies de teleósteos más prometedoras, se encuentran los peces planos Soleideos, ya que existen métodos de cultivo para estas especies, y además pueden generar nuevas oportunidades de mercado.

Los métodos de cultivo para los Soleideos, como por ejemplo el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) o el lenguado común (*Solea solea*), han mejorado mucho en las últimas dos décadas (Howell, 1997; Dinis et al., 1999; Rueda-Jasso et al., 2004). Varios estudios han demostrado que el lenguado senegalés posee un mayor crecimiento en cautividad que el lenguado común (Olmedo et al., 2003; Rodríguez y Souto, 2003) y, por lo tanto, puede ser un mejor candidato para la comercialización a gran escala. Se han obtenido puestas naturales a partir de lenguados senegaleses aclimatados a condiciones de cautividad, y se han optimizado métodos para el cultivo de larvas y alevines (Dinis, 1992; Vázquez et al., 1994; Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Aragão et al., 2004ab; Morais et al., 2005; Anguis y Cañavate, 2005). Por lo tanto, esta especie es de gran interés para la investigación acuícola en

---

**Abreviaturas:** ANOVA, análisis de varianza; DE, densidad espermática; DME, duración de la motilidad de los espermatozoides; E<sub>2</sub>, 17β-estradiol; ELISA, “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”; EVAc, etileno vinilo acetato; FSH, hormona estimulante del folículo ovárico; FOM, maduración final de los oocitos; GnRH, neuropéptido liberador de hormonas gonadotropinas; GnRH<sub>a</sub>, análogo de GnRH; IET, índice de espermatozoides en el testículo; IGS, índice gonadosomático; 11-KT, 11-ketotestosterona; PV, peso corporal vivo; Stc, espermatocrito; T, testosterona.

el sur de Europa, especialmente en España y Portugal. Sin embargo, varios aspectos de su cultivo deben de ser resueltos y optimizados, concretamente los métodos para el control de la reproducción en cautividad, especialmente de la primera generación (F1).

La puesta natural del lenguado senegalés en el Mediterráneo tiene lugar en primavera (de marzo a junio), con puestas ocasionales durante el otoño e invierno (Arias y Drake, 1990; Cabral y Costa, 1999; Cabral, 2000). Este patrón de reproducción también se observa en individuos salvajes en cautividad bajo regímenes naturales de temperatura y fotoperiodo (Dinis et al., 1999; Anguis y Cañavate, 2005). Sin embargo, las puestas naturales de individuos salvajes en cautividad son generalmente escasas, requieren largos periodos de adaptación a las condiciones de cautividad, y cuando ocurren son frecuentemente impredecibles y la calidad de los huevos producidos variable. Las fluctuaciones del régimen natural de temperatura entre 17 y 20°C puede aumentar la actividad de puesta (Anguis y Cañavate, 2005), aunque no es conocido como afecta la temperatura a dicho proceso. En los F1, la situación es todavía más complicada, ya que durante el periodo de puesta las hembras llegan a desarrollar vitelogénesis y maduración final de los oocitos (FOM), pero no son capaces de llevar a cabo la ovulación y la puesta.

La aplicación de terapias hormonales basadas en la administración del análogo del neuropéptido liberador de hormonas gonadotropinas (GnRHa), que activa la síntesis y liberación de las hormonas gonadotropinas en la glándula pituitaria, es una estrategia común para resolver disfunciones reproductivas en peces de cultivo (Crim y Bettles, 1997; Mylonas y Zohar, 2001; Zohar y Mylonas, 2001). En la mayoría de casos, estos métodos son suficientes para inducir la ovulación y puesta en teleósteos que normalmente

no se reproducen en cautividad. También son capaces de sincronizar la puesta, con lo cual se optimiza la recolección de huevos en aquellas especies de teleósteos que sí maduran espontáneamente en cautividad (salmónidos). En peces planos, los tratamientos de GnRH<sub>a</sub> promueven la ovulación y la puesta en hembras (Ramos, 1986ab; Harmin y Crim, 1992; Scott et al., 1999; Mugnier et al., 2000), aunque en la platija del Norte (*Pleuronectes platessa*), el fletan (*Hippoglossus hippoglossus*), la platija de verano (*Paralichthys dentatus*) y del Sureste (*P. lethostigma*), su administración en machos tiene un débil efecto a la hora de inducir o aumentar la producción de esperma (Berlinsky et al., 1996, 1997; Vermeirssen et al., 1998, 2000; Tvedt et al., 2001).

En el lenguado senegalés, estudios preliminares que han empleado tratamientos con GnRH<sub>a</sub> no han sido eficaces para inducir la puesta, o la producción de huevos ha sido de baja calidad (Dinis, 1986; citado en Dinis et al., 1999). En este trabajo, se describen una serie de estudios llevados a cabo durante tres años consecutivos en los que se ha investigado la eficiencia de diferentes vías de administración de GnRH<sub>a</sub>, inyección intramuscular o implantes de liberación sostenida, para inducir a la puesta y la espermiación en hembras y machos, respectivamente. También se han determinado los cambios en los niveles plasmáticos de esteroides sexuales durante los diferentes tratamientos.

## **4.2. Material y Métodos**

### **4.2.1. Manejo de reproductores**

Lenguados senegaleses adultos, generación F1, de aproximadamente 1-2 años de edad, fueron criados a partir de diferentes stocks de individuos

salvajes aclimatados a las instalaciones del CIFPA El Toruño (Puerto de Santa María, Cádiz, España). Una selección de éstos animales fue transportada hasta el Centro de Acuicultura-IRTA y mantenida durante aproximadamente un año antes de empezar los experimentos. Durante el proceso de adaptación, los peces fueron alimentados *ad libitum* una vez al día con pellets comerciales (Proaqua, España) y estabulados bajo condiciones naturales de temperatura y fotoperiodo en tanques rectangulares de 12.000 L. Aproximadamente tres meses antes de empezar los experimentos, los peces fueron alimentados *ad libitum* con una dieta casera compuesta de 44% de harina para reproductores (Proaqua, España), 22% de calamares frescos, 22% de mejillones frescos, 11% de aceite para reproductores (Incromega, Croda, España), y 1,3% de vitaminas (Nutreco).

Para los experimentos con individuos salvajes, los peces se obtuvieron de lagunas costeras en la Bahía de Cádiz (España), siendo adaptados y mantenidos en cautividad en las instalaciones del CIFPA El Toruño tal y como es descrito por Anguis y Cañavate (2005).

Los peces fueron sexados y marcados con tags para su posterior monitorización. Ya que las biopsias de ovario resultan muchas veces estresantes o traumáticas para las hembras, éstas fueron identificadas por tacto abdominal tal y como describen Anguis y Cañavate (2005). Según este sistema, el estadio 0 corresponde a gónadas externamente indetectables, el estadio I corresponde a ovarios que se pueden detectar por tacto sobre el área ventral de la hembra, estadios II y III corresponden a diferentes grados de desarrollo, en los cuales el ovario se detecta abultado a simple vista (grado inicial e intermedio respectivamente), y el estadio IV corresponde al máximo abultamiento visible del ovario como resultado de la hidratación de los oocitos durante la maduración. Los machos fueron sexados a partir de la palpación

de los testículos por suave presión en el abdomen y una suave presión sobre los testículos en busca de pequeñas cantidades de esperma. En aquellos casos que el sexo no pudo ser identificado, las hembras se sexaron mediante detección de vitelogenina plasmática empleando “Western blot” usando el anticuerpo comercial monoclonal anti-Vtg de *Fundulus heteroclitus* (ND-5F8, Biosense), el cual muestra reacción cruzada con la Vtg del lenguado senegalés (datos no mostrados).

#### 4.2.2. Protocolos experimentales para los tratamientos con GnRHa

Desde el año 2002 hasta el 2004, los peces fueron mantenidos bajo condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura antes de ser seleccionados en primavera (abril-mayo) y otoño (octubre), los dos periodos de puesta anuales. Cada año se llevaron a cabo diferentes experimentos para testar la efectividad de diferentes métodos de administración de GnRHa. El análogo de GnRH utilizado fue [D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>, NEt] GnRHa (Bachem Bioscience, Alemania). En todos los casos, los peces fueron trasladados a tanques circulares de 1.500 L (densidad de 0,6-0,8 kg/m<sup>2</sup>) conectados a un sistema de recircularización del agua para el control de la temperatura, y los tratamientos hormonales fueron suministrados por duplicado (3-5 machos y hembras por tanque). El fotoperiodo se mantuvo a 13L:11O, y el ratio hembra:macho por tanque fue aproximadamente 1:1. Durante los experimentos, los peces fueron alimentados con la dieta descrita anteriormente.

##### 4.2.2.1. Inyecciones intramusculares de GnRHa

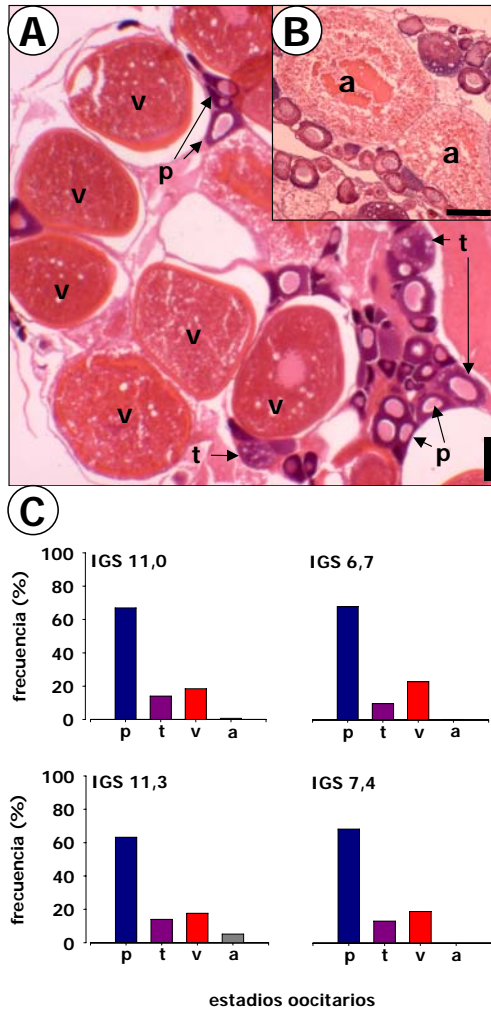
Durante la primavera del 2002 se realizó un estudio preliminar, en el cual peces F1 (0,7-0,8 kg de peso) fueron inyectados intramuscularmente con GnRHa disuelto en NaCl al 0,6% (tampón salino) con dosis de 1, 5 ó 30

$\mu\text{g}$  GnRHa/kg de peso corporal vivo (PV) bajo un régimen de temperatura natural. Los individuos control fueron tratados con salino.

En siguientes experimentos realizados durante el año 2003 con individuos de 1,2-1,3 kg de peso, se investigó el efecto de la época del año (primavera o otoño) sobre el tratamiento con inyecciones intramusculares. Para estos experimentos se seleccionaron hembras con un desarrollo ovárico en los estadios II-III, y machos tanto espermiantes como no espermiantes. Durante la primavera, los peces fueron inyectados una vez a la semana (s) o cada tres días (3d) durante 30 días consecutivos con una dosis de 5  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg. La temperatura en los tanques se mantuvo bajo fluctuaciones semanales de 16 a 21°C, con el fin de optimizar la calidad de la puesta (Anguis y Cañavate, 2005). En otoño, individuos salvajes adaptados a cautividad durante un periodo de dos años fueron inyectados semanalmente con 1 ó 5  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg durante 30 días, fluctuando la temperatura de manera natural de 18 a 21°C durante el periodo de tratamiento. En ambos experimentos, los individuos control fueron tratados con salino.

#### 4.2.2.2. Implantes de GnRHa

Durante la primavera del 2004, el objetivo de los experimentos fue dirigido a comparar la eficiencia de implantes de GnRHa *versus* inyecciones repetitivas de GnRHa para inducir la puesta en un stock F1. Antes del tratamiento, un grupo de machos y hembras ( $n= 4$ ) del stock fueron seleccionados al azar y sacrificados, recogiendo su índice gonadosomático (IGS: peso gonadal/peso corporal x 100). Fragmentos de las gónadas fueron fijados en la solución 4F:1G de McDowell y Trump (1976) para su examen histológico. Los machos seleccionados para el tratamiento hormonal (0,8-0,9 kg de peso) mostraron signos de espermiación, mientras que las hembras (1,0-1,2



**Fig. 4.1.** Desarrollo ovárico de hembras F1 de lenguado senegalés. (A) micrografías representativas de secciones histológicas de ovario durante la primavera antes del tratamiento hormonal. Oocitos previtelogénicos (p), oocitos en vitelogénesis temprana (t), oocitos vitelogénicos (v). Escala 200 μm. (B) Oocitos desarrollando atresia (a). Escala 200 μm. (C) Perfiles ováricos de oocitos p, t, v y a en el ovario de cuatro hembras diferentes antes de comenzar el tratamiento hormonal. La frecuencia de los oocitos p, t, v y a se calculó como porcentaje a partir de 3 secciones histológicas diferentes del mismo fragmento de ovario por hembra. Los IGS correspondientes están indicados.

kg de peso) se encontraban en los estadios I-II de desarrollo ovárico, con un IGS de 6,7-11,3 (Fig. 4.1.). El posterior análisis histológico de las cuatro hembras indicó la presencia de oocitos en varios estadios de desarrollo: previtelogénicos, en vitelogénesis temprana y vitelogénicos, pero no se detectaron oocitos en fase de maduración (Fig. 4.1.A). En los oocitos vitelogénicos la vesícula germinal todavía ocupaba una posición central, y en algunas



hembras, el ovario contenía oocitos comenzando el proceso de atresia, aunque todavía con una baja frecuencia (Fig. 4.1.B y 4.1.C). El testículo de los machos muestreados mostraba un pleno desarrollo de los túbulos seminíferos conteniendo todos los tipos de células germinales, incluyendo espermatozoides (datos no mostrados).

Machos y hembras fueron inyectados semanalmente con 5 µg GnRHa/kg o tratados con un único implante de etileno vinilo acetato (EVAc) cargado con GnRHa (Mylonas y Zohar, 2001). Las puestas se monitorizaron durante 20 días consecutivos. Los implantes cilíndricos de GnRHa (2 mm de diámetro y 3 mm de longitud) fueron insertados bajo la piel de la musculatura dorsal a través de una jeringa especial a dosis de 5, 25 ó 50 µg GnRHa/kg. Los individuos control fueron tratados con implantes sin GnRHa. En este experimento, la temperatura se mantuvo constante a 19-20°C, ya que ni las largas ni las cortas fluctuaciones de temperatura realizadas en los experimentos previos mostraron ningún efecto positivo para la inducción a la puesta (ver resultados). Al final de los tratamientos, algunos machos y hembras de cada grupo experimental ( $n= 3-4$ ) fueron sacrificados, los IGS registrados y pequeñas piezas gonadales fijadas para su posterior análisis histológico.

#### 4.2.3. Análisis de esteroides

Antes de suministrar cada tratamiento (tiempo cero), y una vez por semana a partir del inicio y hasta el final del tratamiento, los individuos eran sedados con 100 ppm de 2-fenoxietanol (Acros Organics, USA) y aproximadamente 0,5 ml de sangre era extraída de la vena caudal con una jeringa heparinizada, centrifugada y el plasma resultante congelado a -80°C hasta el momento de su análisis. En el 2004, las muestras de sangre fueron tomadas antes y después de los 20 días de administración con GnRHa.

Los niveles plasmáticos de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ , medido sólo en hembras), testosterona (T) y 11-ketotestosterona (11-KT, determinada sólo en machos) fue cuantificada por ELISA (“Enzim-linked Immunosorbent Assay”), siguiendo el método descrito por Rodríguez et al. (2000). Los esteroides libres fueron extraídos a partir de 3,5  $\mu$ l de plasma en 1 ml de metanol. Los estándares para el  $E_2$ , T y 11-KT, los anticuerpos específicos de conejo contra estos esteroides, el anticuerpo monoclonal IgG de ratón anti-conejo y los trazadores enzimáticos esteroides acetilcolinesterasa conjugados ( $E_2$ -AChE, T-AChE, y 11-KT-AChE) fueron obtenidos de Cayman Chemical Company (Michigan, USA). Las placas de 96 pocillos (MaxiSorp™) fueron obtenidas de Nalgene Nunc Internacional (Rochester, USA). Una curva estándar de  $6,1 \times 10^{-4}$  a 2,5 ng/ml fue establecida en todos los ensayos. Estándares y muestras fueron medidos por duplicado. Los límites mínimos de detección (al 80% de unión, ED80) fueron  $1,7 \pm 2,1$  pg/ml para  $E_2$  ( $n = 11$ ),  $1,5 \pm 0,2$  pg/ml para T ( $n = 17$ ), y  $0,9 \pm 0,2$  pg/ml para 11-KT ( $n = 8$ ). Los coeficientes de variación inter-ensayo al 50% de unión fueron del 28,7% para  $E_2$  ( $n = 11$ ), 6,3% para T ( $n = 17$ ), y 4,1% para 11-KT ( $n = 8$ ). Los coeficientes de variación intra-ensayo (calculados a partir de los duplicados) fueron  $4,6 \pm 0,7\%$  para  $E_2$  ( $n = 11$ ),  $3,1 \pm 0,3\%$  para T ( $n = 17$ ), y  $5,7 \pm 0,7\%$  para 11-KT ( $n = 8$ ). El máximo valor de reacción cruzada entre los anticuerpos empleados fue: anti- $E_2$ , 4,0% con estrona; anti-T, 3,7% con androstenediona; y anti-11-KT, 0,01% con 4-androsten-11 $\beta$ -17 $\beta$ -diol-3-ona (descrito por el fabricante).

#### 4.2.4. Recolección de huevos y evaluación de la calidad de los gametos

Los huevos se recogieron tres veces al día mediante recogedores de huevos situados en la salida del agua de los tanques. Para determinar la calidad de las puestas, se calculó el porcentaje de huevos no flotantes respecto a los flotantes mediante la separación de los huevos en una probeta calibrada durante aproximadamente 1h. Los huevos flotantes fueron inmediatamente incubados en diferentes tanques a 19°C para determinar la eficiencia de eclosión. La tasa de fertilización se realizaba en fracciones de 100 huevos bajo una lupa. La fecundidad fue expresada como producción total de huevos o como fecundidad relativa (huevos/kg de hembra).

Durante los tratamientos con GnRH $\alpha$ , los machos espermiantes fueron identificados por ligera presión abdominal aproximadamente cada semana, y cuando era posible, el semen fue recogido. Si este se encontraba libre de orina, el volumen total era medido mediante una micropipeta. La densidad espermática (DE) fue determinada en esperma diluído 1:100 ó 1:200, empleando una cámara de Neughbauer y un microscopio óptico Leica DMLB. Cuando el esperma estaba limpio, también se obtenía el espermato-crito (Sct) usando un capilar, que era centrifugado a 13.000 rpm durante 10 min. Para medir la motilidad de los espermatozoides, el esperma fue diluido 1:100 en agua de mar filtrada, siendo rápidamente situado sobre portas y observado a 200x aumentos bajo el microscopio. La duración de la motilidad de los espermatozoides (DME) fue definida como el tiempo desde la activación de la motilidad espermatozoides hasta que cesaba completamente su movimiento (Lim et al., 2004).

#### 4.2.5. Análisis histológico

Las gónadas fijadas fueron incluidas en resina de glicol metacrilato (Technovit 7100, Heraeus Kultzer, Alemania). Se realizaron secciones de 3  $\mu\text{m}$  y se tiñieron con azul/azure II/fucsina básica (Bennett et al., 1976). El perfil de frecuencia de los diferentes estadios ovocitarios en el ovario se determinó a partir de las secciones histológicas bajo un microscopio óptico. El porcentaje de oocitos previtelogénicos, vitelogénicos tempranos, vitelogénicos avanzados y atrésicos (Fig. 2.1.a) eran expresados como porcentaje ( $n= 100-150$  folículos) en al menos 3 secciones histológicas diferentes del mismo fragmento de ovario.

En los experimentos con implantes de GnRH $\alpha$ , el índice de espermatozoides en el testículo (IET) fue calculado como una estimación de la cantidad de espermatozoides presentes. El IET fue determinado tras el examen histológico de al menos 3 secciones histológicas de cada macho al finalizar el periodo experimental. El número de espermatozoides fue registrado a partir de al menos 3 diferentes túbulos seminíferos en cada sección, calculando así el número medio de espermatozoides por túbulo.

#### 4.2.6. Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Los datos fueron estadísticamente analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores, seguido por el test de comparación de medias de Tukey. Cuando fue necesario, y especialmente para los niveles de esteroides en plasma que mostraron grandes variaciones, los datos fueron transformados logarítmicamente para obtener varianzas homogéneas. El nivel de significancia para todos los test se fijó en  $P < 0,05$ .

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Inducción a la puesta mediante inyección de GnRHa

En un primer experimento, machos y hembras F1, fueron estimulados durante la primavera del 2002 mediante inyección de GnRHa (Tabla 4.1.). Las hembras control no mostraron ninguna puesta espontánea, mientras que las hembras inyectadas con 1 ó 5 µg GnRHa/kg mostraron puestas después de 3-4 días desde la inyección. La dosis de 30 µg GnRHa/kg no fue efectiva. Las hembras inyectadas con 1 µg GnRHa/kg produjeron 55.000 huevos en total con una fecundidad relativa de 25.688 huevos/kg, mientras la dosis de 5 µg GnRHa/kg indujo más ovulaciones por hembra con una producción total de 165.000 huevos y una fecundidad relativa de 65.476 huevos/kg. En ambos casos el porcentaje de huevos flotantes fue similar (36,1% y 48,7±14,1%). No obstante, en ningún caso los huevos producidos estaban fertilizados.

En posteriores experimentos, llevados a cabo durante el año 2003, un stock de individuos más adultos fueron inyectados una vez a la semana o cada tres días con 5 µg GnRHa/kg a lo largo de 30 días. Los tratamientos resultaron en un mayor número de puestas por hembra con respecto a la experiencia preliminar. Así, el número de puestas fue mayor en hembras inyectadas con GnRHa cada 3 días (36 puestas) que en aquellas inyectadas con GnRHa una vez por semana (20 puestas), mientras que en las hembras control no se observó ninguna puesta (Tabla 4.1. y Fig. 4.2.). La producción de huevos de las hembras inyectadas con GnRHa una vez por semana aumentó aproximadamente a partir del tercer día tras la inyección. Tanto el número de huevos como la fecundidad relativa fueron mayores que en la experiencia

**Tabla 4.1.** Efecto de la inyección de GnRHa para la inducción de la puesta de hembras de lenguado senegalés F1 y salvajes durante la primavera y el otoño.

Tratamiento ( $\mu\text{g}$ GnRHa/kg)	<i>n</i>	Peso medio (kg)	Pu- es- tas ( <i>n</i> )	Huevos totales	Fecundidad relativa (hue- vos/kg)	Flotabilidad (%) <sup>1</sup>
2002 (F1, primavera)						
Salino (1)	6	0,8 $\pm$ 0,05	0	-	-	-
1 (1)	3	0,7 $\pm$ 0,07	2	55.000	25.688	36,1
5 (1)	3	0,7 $\pm$ 0,02	5	165.000	65.476	48,7 $\pm$ 14,1 <sup>ab</sup>
30 (1)	3	0,8 $\pm$ 0,02	0	-	-	-
2003 (F1, primavera)						
Salino (s)	8	1,3 $\pm$ 0,09	0	-	-	-
5 (s)	9	1,3 $\pm$ 0,06	20	1.756.500	151.684	43,7 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>
5 (3 d)	9	1,2 $\pm$ 0,06	36	2.869.500	256.228	53,7 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
2003 (salvaje, otoño)						
Salino (s)	6	1,6 $\pm$ 0,1	0	-	-	-
1 (s)	6	1,9 $\pm$ 0,2	14	399.000	35.820	29,1 $\pm$ 4,0 <sup>c</sup>
5 (s)	6	1,9 $\pm$ 0,2	5	80.000	7.148	4,2 $\pm$ 1,4 <sup>d</sup>

Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Como se indica para cada año, la GnRHa fue administrada en una única dosis (1), semanalmente (s) o cada tres días (3 d). Los tratamientos se efectuaron por duplicado durante un periodo de 30 días. Los datos de cada réplica se han combinado (para la producción de huevos, el sumatorio de la producción diaria de ambos tanques está indicado).

<sup>1</sup>Calculado a partir del número de huevos flotantes y no flotantes en cada puesta. Diferentes superíndices indican diferencias significativas (ANOVA;  $P < 0,05$ ) entre valores dentro de la misma columna.

preliminar, y este aumento estuvo correlacionado positivamente con el número de inyecciones de GnRHa aplicadas. Así, las hembras inyectadas semanalmente o cada 3 días produjeron 1.756.000 huevos y 151.684 hue-

**Tabla 4.2.** Efecto de la inyección semanal de GnRHa durante el mes de otoño sobre la producción y la calidad del esperma de machos salvajes de lenguado senegalés.

Tratamiento ( $\mu\text{g}$ GnRHa/kg)	<i>n</i>	Peso medio (kg)	Machos espermian- tes ( <i>n</i> )	Volumen de esperma ( $\mu\text{l}$ )	Sct <sup>1</sup> (%)	DE <sup>2</sup> ( $\times 10^9/\text{ml}$ )	DME <sup>3</sup> (seg)
Salino	6	1,4 $\pm$ 0,1	5	34 $\pm$ 6	15,4 $\pm$ 4,7	2,0 $\pm$ 1,0	60 $\pm$ 20
1	6	1,2 $\pm$ 0,1	5	30 $\pm$ 5	22,2 $\pm$ 7,2	3,1 $\pm$ 1,0	132 $\pm$ 49
5	6	1,3 $\pm$ 0,3	5	27 $\pm$ 6	13,2 $\pm$ 4,8	2,6 $\pm$ 1,0	96 $\pm$ 50

<sup>1</sup>Stc, espermatocrito; <sup>2</sup>DE, densidad del esperma; <sup>3</sup>DME, duración de la motilidad de los espermatozoides. Estos parámetros no variaron significativamente durante los muestreos semanales, como indica la media  $\pm$  SEM. Otros detalles como en la tabla 4.1.

vos/kg; y 2.869.000 huevos y 256.228 huevos/kg, respectivamente (Tabla 4.1.). No obstante, a pesar de que el número de huevos flotantes fue similar entre tratamientos (43,7 $\pm$ 1,3% y 53,7 $\pm$ 0,8%), y equivalente a lo observado en la experiencia preliminar, los huevos no fueron fecundados.

El efecto de la inyección de GnRHa fue de nuevo investigado durante el segundo periodo anual de puesta, en otoño, utilizando individuos salvajes adaptados a condiciones de cautividad. Machos y hembras fueron inyectados semanalmente con 1 ó 5  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg durante aproximadamente un mes (Tabla 4.1.). Durante las primeras dos semanas la temperatura en los tanques se controló para inducir un descenso desde 20°C a 18°C, y aumentar de nuevo a 21°C durante las dos últimas semanas (Fig. 4.2.). Tal y como se observó en las experiencias anteriores, las hembras inyectadas con salino no produjeron puestas. La inyección con GnRHa fue de nuevo eficaz para indu-

cir la ovulación, pero en este caso la respuesta de las hembras a dosis mayores fue diferente de la respuesta observada en primavera. Durante el otoño, la inyección con 1 µg GnRHa/kg indujo 14 puestas, mientras que la dosis de 5 µg GnRHa/kg, que en primavera fue la más eficaz, sólo indujo 5 puestas (Tabla 4.1. y Fig. 4.2.). El número de huevos producidos y la fecundidad relativa fueron más bajos que los obtenidos en primavera (Tabla 4.1.). La flotabilidad de los huevos producidos con la dosis de 5 µg GnRHa/kg fue significativamente ( $P < 0,05$ ) más baja que la observada con la dosis de 1 µg GnRHa/kg, pero en ambos casos fue significativamente ( $P < 0,05$ ) más baja que la observada en primavera (Tabla 4.1.).

Los machos examinados en otoño, tanto los tratados con salino como con GnRHa, mostraron aproximadamente el mismo número de machos espermiantes (Tabla 4.2.). Además, no se detectaron diferencias significativas en la media del volumen de esperma producido, el Sct, la SD o el SMD entre los tratados con GnRHa y los no tratados (Tabla 4.2.).

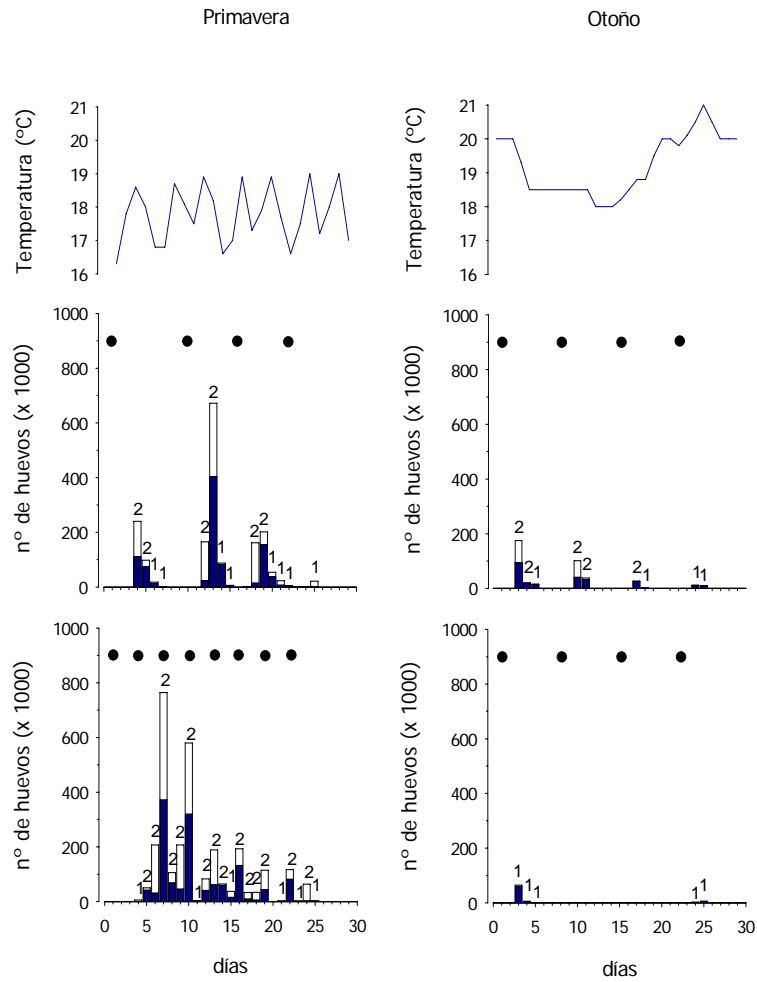
#### 4.3.2. Perfil de los niveles esteroides sexuales en plasma tras la inyección con GnRHa

Durante la primavera y el otoño, los niveles plasmáticos de  $E_2$  aumentaron a los siete días de tratamiento con GnRHa (Fig. 4.3.). En primavera, el incremento de  $E_2$  en las hembras inyectadas cada 3 días con 5 µg GnRHa/kg fue mayor que en las inyectadas semanalmente con la misma dosis (Fig. 4.3.A). En ambos casos, el  $E_2$  descendió durante la segunda y tercera semana de tratamiento con GnRHa hasta ser similar al de los controles. Un efecto similar sobre los niveles de  $E_2$  plasmático se observó en las hembras inyectadas con GnRHa en otoño, aunque en este caso los niveles

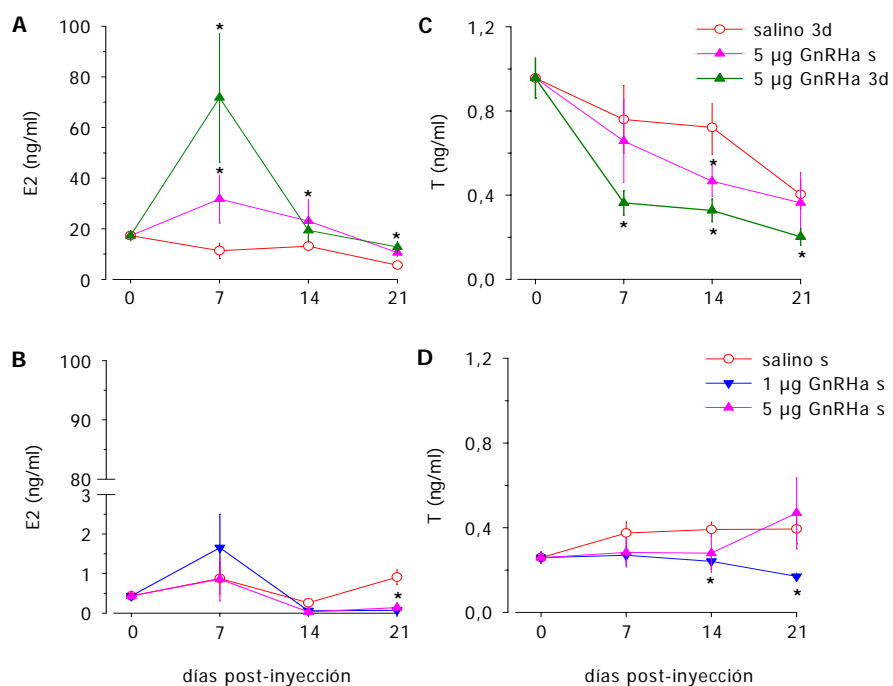


fueron muy inferiores a los detectados en primavera. En otoño, los mayores niveles de  $E_2$  se detectaron en hembras inyectadas con  $1 \mu\text{g GnRHa/kg}$  aunque no fueron estadísticamente significativos respecto a los valores del grupo control. Las hembras inyectadas con  $5 \mu\text{g GnRHa/kg}$  no mostraron incremento alguno de los valores plasmáticos de  $E_2$  (Fig. 4.3.B). Tanto en primavera como en otoño, los valores plasmáticos de T decrecieron tal como el  $E_2$  aumentaba, mostrando una relación inversa durante el periodo de tratamiento con GnRHa. Durante la primavera, los niveles de T fueron significativamente menores en las hembras tratadas con  $5 \mu\text{g GnRHa/kg}$  cada 3 días, y durante el otoño las hembras inyectadas con  $1 \mu\text{g GnRHa/kg}$  mostraron los niveles más bajos de T (Fig. 4.3.C y 4.3.D).

Los niveles plasmáticos de T y 11-KT se determinaron en los machos tratados con GnRHa y en los no tratados (Fig. 4.4.). Durante la primavera, los niveles plasmáticos de T no variaron tras el tratamiento con GnRHa (Fig. 4.4.A), mientras que los valores de 11-KT fueron significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores en machos tratados con  $5 \mu\text{g GnRHa/kg}$  cada 3 días (Fig. 4.4.C). Durante el otoño, los machos tenían en general niveles plasmáticos de 11-KT más bajos que en primavera, mientras que los niveles de T fueron similares. Sin embargo, durante esta época del año, el tratamiento con GnRHa pareció disminuir los niveles de ambos andrógenos, ya que tanto machos inyectados con  $1$  ó  $5 \mu\text{g GnRHa/kg}$  mostraron niveles significativamente ( $P < 0,05$ ) más bajos de T y 11-KT que el grupo control (Fig. 4.4.B y 4.4.C).



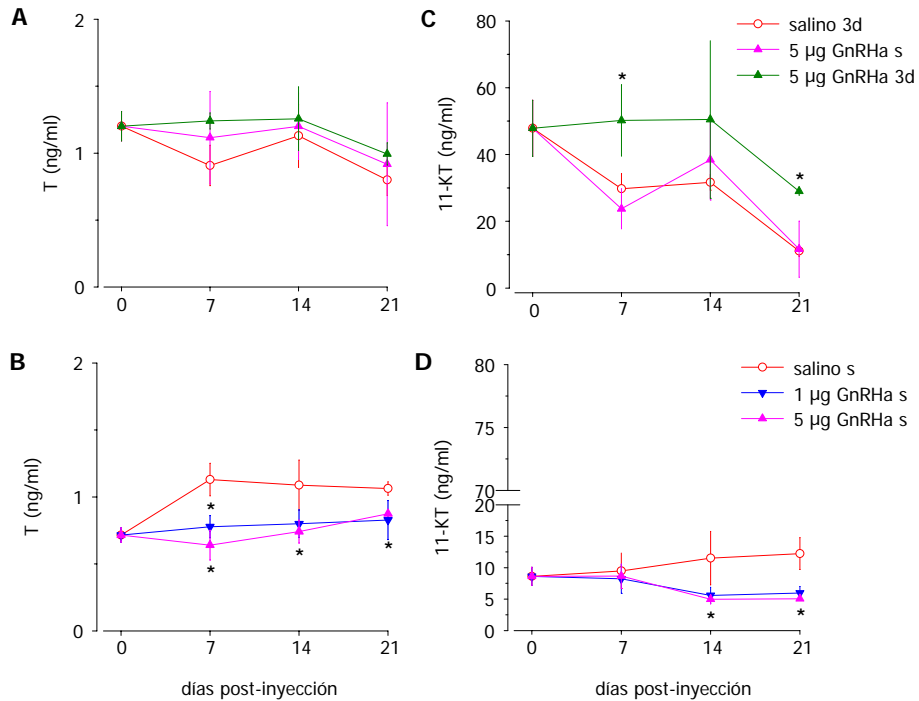
**Fig. 4.2.** Producción diaria de huevos de hembras de lenguado senegalés ( $n = 6-9$  por tratamiento) seleccionadas en primavera o otoño y inyectadas con GnRHa bajo temperatura controlada. En primavera, los animales fueron inyectados con  $5 \mu\text{g}$  GnRHa/kg una vez a la semana o cada 3 días (paneles superior e inferior respectivamente). En otoño, los individuos fueron inyectados con 1 ó  $5 \mu\text{g}$  GnRHa/kg (paneles superior e inferior respectivamente). Los datos muestran la suma de los datos de ambas réplicas. En cada panel, los puntos indican los días de inyección, y los números sobre cada barra indican el número diario de puestas observadas. Los peces control inyectados con salino no mostraron puestas (datos no indicados). Las barras azules indican la cantidad de huevos no flotantes, mientras que las barras de color blanco muestran la cantidad de huevos flotantes.



**Fig. 4.3.** Cambios en los niveles plasmáticos de E<sub>2</sub> y T en hembras inyectadas con GnRHa durante primavera (A y C) y otoño (B y D). En primavera, los individuos fueron inyectados con 5 µg GnRH/kg semanalmente (s) o cada 3 días (3 d). Los individuos control fueron inyectados con salino cada 3 días. En otoño, los individuos fueron inyectados con salino, 1 ó 5 µg GnRH/kg semanalmente. Los datos corresponden a la media ± SEM ( $n = 5-6$  hembras). Los asteriscos denotan diferencias significativas respecto a los valores control (ANOVA,  $P < 0,05$ ).

#### 4.3.3. Inducción a la puesta con implantes de GnRH

En estos experimentos se comparó la eficiencia del tratamiento con GnRH, administrado en pellets de EVAc o por inyección, para inducir a la puesta de un stock F1 durante el periodo de primavera. Hembras F1 fueron implantadas una única vez durante un periodo de 20 días con pellets de



**Fig. 4.4.** Cambios en los niveles plasmáticos de T y 11-KT en machos inyectados con GnRH durante primavera (A y C) y otoño (B y D). Detalles como en la Fig. 4.3.

EVAc conteniendo salino, ó 5, 25 ó 50  $\mu\text{g}$  GnRH/kg, mientras que otros machos y hembras del mismo stock fueron inyectados semanalmente con 5  $\mu\text{g}$  GnRH/kg (Tabla 4.3.).

En el grupo control se observaron dos puestas espontáneas (Tabla 4.3. y Fig. 4.5.A), mientras que las hembras inyectadas produjeron tres puestas con un total de 174.000 huevos (Tabla 4.3. y Fig. 4.5.B). Las hembras implantadas con GnRH tuvieron un número mayor de puestas que el resto de los grupos experimentales. Así, mientras que la dosis de implante con 5  $\mu\text{g}$  GnRH/kg resultaron inefectivas, las dosis de 25 y 50  $\mu\text{g}$  GnRH/kg re-

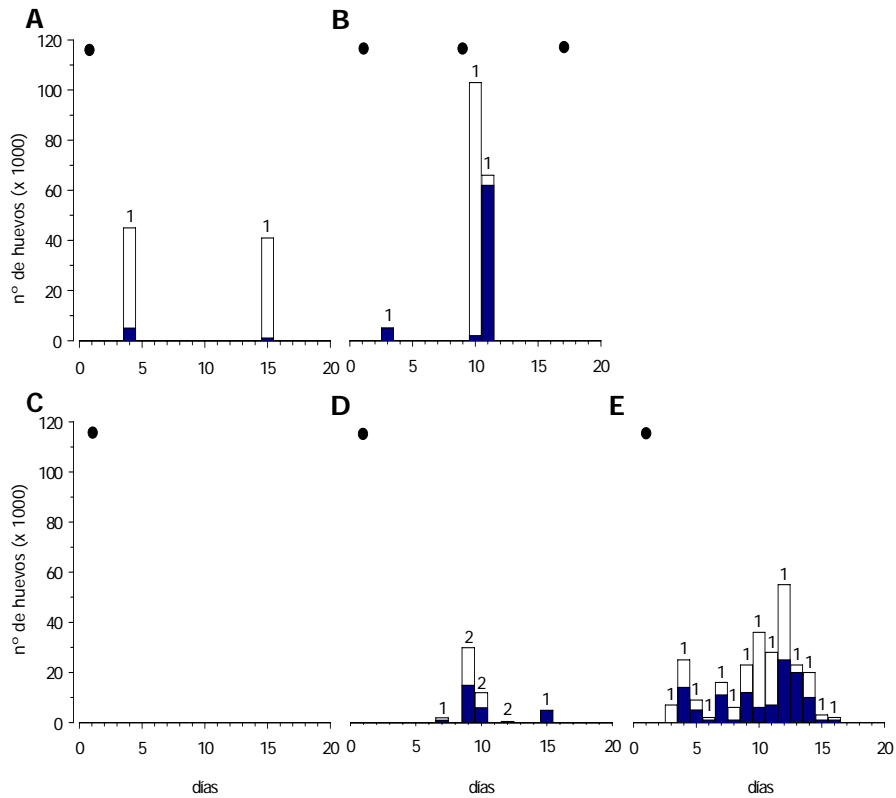
**Tabla 4.3.** Efecto de implantes o inyecciones semanales de GnRH $\alpha$  en la inducción a la puesta de hembras F1 de lenguado senegalés durante la primavera.

Tratamiento ( $\mu$ g GnRH $\alpha$ /kg)	<i>n</i>	Peso medio (kg)	Puestas ( <i>n</i> )	Huevos totales	Fecundidad relativa (Huevos/kg)	Flotabilidad <sup>1</sup> (%)
Salino	9	1,2 $\pm$ 0,1	2	86.000	11.582	93,4 $\pm$ 4,5
5	9	1,0 $\pm$ 0,1	0	-	-	-
25	12	1,1 $\pm$ 0,1	8	48.000	6.138	26,2 $\pm$ 9,5 <sup>b</sup>
50	5	1,2 $\pm$ 0,1	14	255.000	41.116	61,5 $\pm$ 10,3 <sup>a</sup>
5 (inyección)	5	1,2 $\pm$ 0,1	3	174.000	29.082	51,0 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>

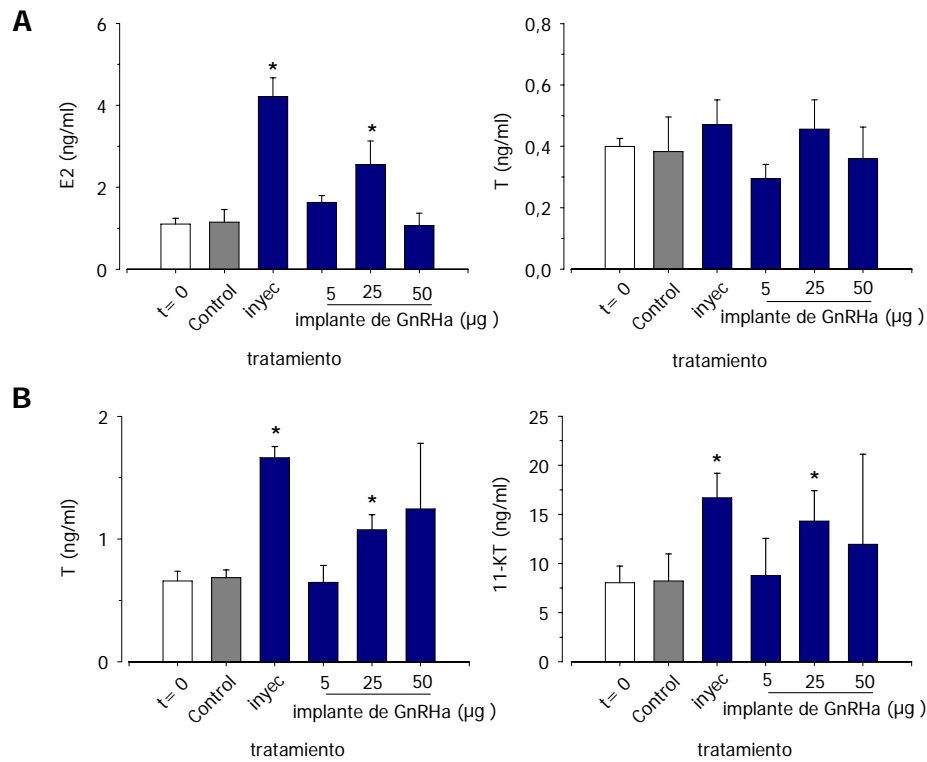
Los implantes de GnRH $\alpha$  se administraron una única vez y los individuos fueron seguidos durante un periodo de 20 días. Para comparar, un grupo fue inyectado semanalmente con GnRH $\alpha$ .

<sup>1</sup>Para los controles, implantados con salino, el porcentaje de flotabilidad para cada una de las dos puestas está indicado. Otros detalles como en la tabla 4.1.

sultaron en 8 y 14 puestas consecutivas, con una producción total de 48.000 y 255.000 huevos respectivamente (Tabla 4.3. y Fig. 4.5.C y 4.5.E). Las hembras implantadas con 50  $\mu$ g GnRH $\alpha$ /kg mostraron la primera puesta tres días tras la implantación, y diariamente durante 14 días consecutivos. El porcentaje de huevos flotantes producidos por las hembras implantadas con 50  $\mu$ g GnRH $\alpha$ /kg o inyectadas con 5  $\mu$ g/kg de GnRH $\alpha$  fue significativamente ( $P < 0,05$ ) mayor que el observado en hembras implantadas con 25  $\mu$ g GnRH $\alpha$ /kg (Tabla 4.3.). Sin embargo, de nuevo, no se observó fecundación en ningún caso.



**Fig. 4.5.** Producción diaria de huevos de hembras de lenguado senegalés ( $n= 5-12$  por tratamiento) tratadas con (A) implante salino, (B) inyección semanal intramuscular de 5 µg GnRH/kg, o un único implante de 5 (C), 25 (D) ó 50 (E) µg GnRH/kg. Los puntos en cada panel indican los días de inyección de GnRH (B) o de la implantación (A, C, D, y E). Otros detalles como en la Figura 4.2.



**Fig. 4.6.** Niveles plasmáticos de E<sub>2</sub> y T en hembras (**A**) y T y 11-KT en machos (**B**) inyectados semanalmente con 5 µg GnRH/kg, o tratados con implante salino o implantes con 5, 25 ó 50 µg/kg de GnRH. Los datos corresponden a la media ± SEM. (*n*= 3-5 individuos) de la concentración de esteroides determinados antes (*t*= 0) y 20 días después de iniciar el tratamiento hormonal. Los asteriscos denotan diferencias significativas respecto a los valores control (ANOVA, *P* < 0,05).

**Tabla 4.4.** Efecto de los implantes de GnRHa o la inyección semanal durante la primavera sobre la producción de esperma de machos F1 de lenguado senegalés después de 20 días de tratamiento

Tratamiento ( $\mu\text{g}$ GnRHa/kg)	<i>n</i>	Peso medio (kg)	IGS <sup>1</sup>	ITE <sup>2</sup>
Salino	6	0,8 $\pm$ 0,1	0,08 $\pm$ 0,01	388 $\pm$ 45
5	3	0,9 $\pm$ 0,1	0,08 $\pm$ 0,02	326 $\pm$ 84
25	3	0,8 $\pm$ 0,1	0,09 $\pm$ 0,02	310 $\pm$ 78
50	3	0,8 $\pm$ 0,0	0,10 $\pm$ 0,02	432 $\pm$ 61
5 (inyección)	3	0,8 $\pm$ 0,1	0,11 $\pm$ 0,02	238 $\pm$ 90

<sup>1</sup>IGS, índice gonadosomático; <sup>2</sup>ITE, índice testicular de espermatozoides. El ITE fue calculado a partir de secciones histológicas tal y como se describe en material y métodos. Este índice puede ser una estimación de la producción de esperma en cada grupo experimental. Otros detalles como en la tabla 4.3.

#### 4.3.4. Perfil de esteroides sexuales en plasma de machos y hembras implantados con GnRHa

Los niveles plasmáticos de los esteroides sexuales en machos y hembras implantados se determinaron tras 20 días de tratamiento hormonal (Fig. 4.6.). Los niveles plasmáticos de E<sub>2</sub> fueron significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores en las hembras inyectadas con 5  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg o implantadas con 25  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg que en las hembras implantadas con salino, mientras que las implantadas con 50  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg mostraron niveles de E<sub>2</sub> similares a las hembras control (Fig. 4.6.A). Esta observación podría ser debida a que estas hembras tratadas con 50  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg tuvieron la mayoría de sus puestas los primeros 15 días tras la implantación, y la sangre fue extraída con posterioridad a la producción de las puestas. Por el contrario, los niveles plasmáticos



de T no mostraron cambios en las hembras implantadas con respecto a los valores de las hembras control. En los machos, los niveles plasmáticos de T y 11-KT fueron significativamente ( $P < 0,05$ ) mayores en los machos inyectados con 5  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg o implantados con 25  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg (Fig. 4.6.B). Los machos implantados con 50  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg mostraron una gran variación en los niveles de T y 11-KT, y por tanto, los valores no resultaron significativamente diferentes con respecto a los valores control.

#### 4.3.5. Desarrollo testicular y producción de esperma de machos implantados con GnRHa

Para evitar cualquier stress a los individuos durante el periodo de tratamiento, los machos fueron muestreados sólo al finalizar los 20 días de la inyección o la implantación con GnRHa. Una vez los animales fueron sacrificados, se determinó el IGS y el ITE (Tabla 4.4.). Los resultados indican que aunque el tratamiento con GnRHa incrementó los niveles plasmáticos de T y 11-KT, este no incrementó significativamente el IGS (Tabla 4.4.). El ITE calculado a partir de secciones histológicas de testículo en cada grupo experimental mostró que GnRHa aparentemente no aumentó la producción de espermatozoides (Tabla 4.4.), incluso cuando los datos fueron normalizados por el peso de los testículos (datos no mostrados). Estas observaciones fueron consistentes con el hecho de encontrar IGSs similares entre individuos tratados y no tratados (Tabla 4.4.), sugiriendo por tanto que la GnRHa es ineficaz a la hora aumentar o inducir la producción de espermatozoides.

#### 4.4. Discusión

El éxito del lenguado senegalés como nueva especie para la acuicultura requiere del establecimiento de protocolos para la inducción a la puesta con el fin de predecir dicho proceso y mejorar la calidad de los gametos. En el lenguado, tanto en la naturaleza como en cautividad, la puesta parece ser influenciada por el aumento de la temperatura durante la primavera (marzo-junio), aunque algunas puestas ocurren en otoño e invierno (Arias y Drake, 1990; Cabral y Costa, 1999; Cabral, 2000; Dinis et al., 1999; Anguis y Cañavate, 2004). Sin embargo, se ha observado que en cautividad las hembras F1 bajo condiciones de cultivo intensivo no ovulan de manera espontánea, a pesar de que el proceso de vitelogénesis y FOM sí tienen lugar. En el presente trabajo, hembras controles, no tratadas hormonalmente, no ovularon de manera espontánea (Tablas 4.1. y 4.3.), o sólo lo hicieron en un par de ocasiones, incluso bajo condiciones de temperatura fluctuante en un rango de 16 a 20°C (Fig. 4.2.). Se ha sugerido que fluctuaciones de temperatura similares podrían estimular la puesta de individuos salvajes de lenguado senegalés adaptados a condiciones de cautividad (Anguis y Cañavate, 2005). En cambio, el tratamiento con GnRH $\alpha$ , en inyección o en implantes, en el momento adecuado, cuando las hembras se encuentran en estado avanzado de vitelogénesis, sí demuestra ser eficiente para inducir la ovulación y la puesta (Fig. 4.1.).

La liberación de análogos de GnRH ha sido capaz de inducir con éxito la maduración y FOM en un gran número de especies de cultivo. Mylonas y Zohar (2001) enumeran nueve especies de peces planos donde la ovulación y/o la puesta fue inducida usando diferentes sistemas de liberación

de GnRHa en un rango de dosis de 30 a 1.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , aunque la respuesta de cada hembra individual, en cuanto número de puestas y fecundidad, es variable. El lenguado senegalés posee un desarrollo ovárico tipo grupo sincrono, esto significa que sucesivos conjuntos de oocitos vitelogénicos comienzan FOM y la ovulación durante el periodo de puesta, quedando siempre una población de oocitos previtelogénicos en reserva (Wallace y Selman, 1981; Fig. 4.1.). Este patrón de desarrollo ovárico, observado también en otras especies de peces planos, a menudo desemboca en múltiples ovulaciones tras la inducción con GnRHa (Mylonas y Zohar, 2001). De acuerdo con estas observaciones, repetidas inyecciones con 5  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg, al igual que la liberación sostenida de los implantes de EVAc con 25 ó 50  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg, son capaces de inducir sucesivas puestas, a menudo diarias, en las hembras del lenguado senegalés (Tablas 4.1. y 4.3.; Fig. 4.2. y Fig. 4.5.). La inyección intramuscular de 5  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg cada 3 días fue ligeramente más eficaz que el implante de 50  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg (3,8 y 2,8 puestas por hembra respectivamente; Tablas 4.1. y 4.3.), aunque en este caso es difícil establecer comparaciones concluyentes, ya que las hembras utilizadas en cada experimento se encontraban en estadios de desarrollo ovocitario ligeramente diferentes. De todas formas, las inyecciones repetitivas requieren frecuente manejo de los individuos, con su consecuente stress, por lo cual probablemente el uso de implantes con 50  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg de durante la primavera (mayo) sea posiblemente la mejor estrategia para inducir múltiples puestas en el lenguado senegalés.

Los niveles plasmáticos de esteroides sexuales en hembras tratadas con GnRHa durante la primavera muestra que el  $\text{E}_2$  aumenta dentro de la primera semana desde el inicio del tratamiento hormonal y comienza a decrecer a partir de ese momento, mientras que la T decrece progresivamente

(Fig. 4.3.A y 4.3.B). Un patrón similar se observa también en otoño (Fig. 4.3.B y 4.3.C). Un incremento inicial de los niveles de  $E_2$  plasmáticos tras las puestas naturales o inducidas ha sido observado en muchas especies marinas con ovario grupo sincrono como el lenguado senegalés, la platija del Norte (Scott et al., 1999), la platija amarilla (*P. ferrugineus*; Larsson et al., 1997), la lubina europea (Prat et al., 2001), y la platija de lomo verde (*Rhombosolea tapirina*; Poortenaar y Pankhurst, 2000). Durante la primavera, el aumento de  $E_2$ , y el consiguiente descenso de la T plasmática, preceden las puestas de mayor fecundidad relativa (Fig. 4.2. y Fig. 4.3.A), sugiriendo que GnRHa es capaz posiblemente de inducir al reclutamiento masivo de oocitos hacia la vitelogénesis con el consiguiente incremento de la actividad aromatasas que convierte T a  $E_2$ . El posterior descenso en los niveles de  $E_2$  plasmáticos podría ser debido a la transformación de los estrógenos en progestágenos por el ovario, proceso asociado a la maduración y ovulación de los oocitos. No obstante, estas conclusiones son todavía preliminares, ya que para establecer conclusiones definitivas se requiere la cuantificación de los niveles endógenos de gonadotropinas plasmáticas tras el tratamiento con GnRHa, lo cual no ha podido ser determinado en este estudio.

Al contrario que en hembras, el tratamiento con GnRHa en machos no aumentó la producción de espermatozoides, lo cual podría ser la consecuencia de la ausencia de fertilización de los huevos producidos. La ineficacia de GnRHa para inducir la espermiación en el lenguado senegalés no es sorprendente, ya que resultados similares se han obtenido en otras especies de peces planos (Mylonas y Zohar, 2001). Por ejemplo, en la platija de verano y en la platija del Sur, el tratamiento con GnRHa disuelto en pellets de colesterol no es eficaz para inducir o aumentar la producción de esperma (Berlinsky et al., 1996; Berlinsky et al., 1997). Una situación mejor se ob-

serva en machos de fletan, donde el tratamiento con GnRH $\alpha$  en implantes de EVAc resulta en un aumento del volumen de esperma y una mejor motilidad de los espermatozoides, aunque con un descenso del espermatocrito (Vermeirssen et al., 2000, 2004). De manera similar, en la platija del Norte (Vermeirssen et al., 1998), la platija brillante (*Platichthys stellatus*; Moon et al., 2003) y la platija de lomo verde (Lim et al., 2004), GnRH $\alpha$  liberado por microesferas de p[Fad-sa] o en pelets de colesterol sólo mejora la fluidez del esperma. El potencial efecto estimulador sobre la motilidad o la fluidez del esperma del lenguado senegalés por GnRH $\alpha$  no ha sido investigado en este trabajo, y por tanto, las causas de la ineficacia del tratamiento con GnRH $\alpha$  para inducir o aumentar la producción de esperma en esta especie permanecen sin resolver.

En este estudio se muestra que los niveles plasmáticos de andrógenos, T y 11-KT, aumentan significativamente tras la implantación con GnRH $\alpha$  durante la primavera (Fig. 4.6.), sugiriendo que esta hormona es capaz de estimular la biosíntesis de andrógenos, posiblemente a través de su acción inductora de la liberación de gonadotropinas. Sin embargo, este aumento de los niveles plasmáticos de andrógenos no fue acompañado de un aumento en el número de espermatozoides o de la producción de esperma en los machos tratados (Tabla 4.4.). El tratamiento con GnRH $\alpha$  es generalmente capaz de aumentar los niveles plasmáticos de andrógenos en gran variedad de teleósteos, incluyendo peces planos (Harmin y Crim, 1993; Moon et al., 2003), y por tanto, parece razonable encontrar elevados niveles de T y 11-KT en plasma de machos de lenguado senegalés tratados con GnRH $\alpha$ . En cambio, en peces planos, elevadas concentraciones de andrógenos en plasma no están siempre asociadas a un aumento en el volumen de esperma, ya que en algunas especies, GnRH $\alpha$  es capaz de estimular la producción de esperma

independientemente de los niveles plasmáticos de andrógenos (Clearwater y Crim, 1998; Vermeirssen et al., 2000; Moon et al., 2003; Lim et al., 2004). Este hecho observado en peces planos sería consistente con el modelo actual para muchos teleósteos según el cual la espermatogénesis parece estar regulada por andrógenos, mientras que los progestágenos, como  $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona, son los principales esteroides relacionados con el proceso de espermiación e hidratación del semen (Borg, 1994; Moon et al., 2003; Vermeirseen et al., 1998, 2004). En este trabajo no se han determinado los niveles plasmáticos de progestágenos, y por tanto, el efecto de GnRHa en la síntesis y/o conversión de progestágenos en el testículo, que explicaría la ineficacia de GnRHa para mejorar la producción de esperma en el lenguado senegalés, debe de ser investigado en el futuro.

Una observación potencialmente interesante es la diferente respuesta de machos y hembras al tratamiento con GnRHa entre primavera y otoño. En mayo, mientras que la inyección de 5  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg fue efectiva para inducir la puesta, la misma dosis no fue adecuada durante el mes de octubre, si bien la dosis de 1  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg indujo unas pocas puestas (Tabla 4.1.). Los niveles plasmáticos de  $E_2$  aumentaron durante los siete días posteriores a la inyección con 5  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg, pero estos niveles fueron unas diez veces inferiores en otoño y no variaron durante el tratamiento con GnRHa (Fig. 4.3.A y 4.3.B). En los machos sucedió algo similar, ya que durante el otoño los niveles plasmáticos de T y 11-KT de los animales inyectados semanalmente con 1 ó 5  $\mu\text{g}$  GnRHa/kg fueron inferiores que los niveles de los machos control, al contrario de lo observado en primavera (Fig. 4.4.). Estas observaciones pueden ser debidas a cambios fisiológicos a lo largo del ciclo reproductivo de la sensibilidad de la pituitaria y/o las gónadas a GnRHa o a las gonadotropinas, respectivamente. La verdadera causa es desconocida, aunque

varios mecanismos, como por ejemplo la desensibilización de los receptores de GnRHa y/o de gonadotropinas, o una retroalimentación negativa de los mecanismos de liberación de las gonadotropinas a causa de la elevada concentración de esteroides en plasma, podrían estar relacionados (Cerdà et al., 1997; Schultz et al., 2001; Amsterdam et al., 2002). Los procesos que regulan la respuesta de la pituitaria y/o las gónadas a GnRHa durante el ciclo reproductivo del lenguado senegalés no han sido estudiados hasta el momento y requieren de más investigación.

En conclusión, el tratamiento con GnRHa en hembras de lenguado senegalés que no son capaces normalmente de llevar a cabo la puesta en cautividad, tanto mediante inyecciones sucesivas o implantes de liberación sostenida, es capaz de inducir la ovulación y la puesta. Sin embargo, el tratamiento de machos con GnRHa es aparentemente inefectivo para estimular los procesos reproductivos (aumento de la espermiación o la producción de espermatozoides), lo cual puede producir la ausencia de fertilización de los huevos producidos por las hembras tratadas con GnRHa. Es claro por tanto que son necesarios más estudios para identificar los mecanismos sociales, medioambientales y endocrinos responsables en la regulación de la reproducción de los machos de lenguado senegalés. El conocimiento de estos procesos es esencial para optimizar los protocolos de tratamiento con GnRHa en los machos para aumentar la producción de esperma y su calidad.

## **5.**

**Estimulación de la espermatogénesis y aumento de la motilidad espermática en machos de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) mediante tratamientos hormonales**





## 5.1. Introducción

El testículo de los vertebrados superiores realiza dos funciones principales: la producción de testosterona (T) y la formación de células germinales haploides, en el proceso conocido como espermatogénesis. Durante la espermatogénesis, las espermatogónias (Sg) localizadas en los lóbulos seminíferos (LS) inician la meiosis, dando lugar a espermátocitos primarios (SpcI), después espermátocitos secundarios (SpcII) y finalmente espermátidas (Spd) haploides, las cuales se diferencian en espermatozoides (Spz) flagelados durante el proceso denominado espermiogénesis. Tanto la producción de Spz como la espermatogénesis se consideran regulados por las gonadotropinas pituitarias: la hormona luteinizante (LH), que actúa sobre las células de Leydig (Lc) localizadas en el espacio intersticial y productoras de T, y la hormona estimulante del folículo (FSH), que actúa sobre las células de Sertoli (Sc) en los LS (Holdcraft y Braun, 2004). No obstante, en mamíferos, diferentes factores de crecimiento y citoquinas también juegan importantes funciones paracrinas para regular la función testicular (Peterson y Soder, 2006).

---

**Abreviaturas:** 17,20 $\alpha$ P, 17,20 $\alpha$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona; 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ P, 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona; ANOVA, análisis de varianza; 20 $\beta$ S, 17,20 $\beta$ ,21-trihidroxipregn-4-en-3-ona; Lc, célula de Leydig; Sc, célula de Sertoli; DE, densidad espermática; DME, duración de la motilidad espermática; ELISA, “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”; EVAc, etileno vinilo acetato; FSH, hormona estimulante del folículo; FOM, maduración final de los oocitos; GnRH, neuropéptido liberador de gonadotropinas; GnRH $\alpha$ , análogo de GnRH; IET, índice de espermatozoides en testículo; IGS, índice gonadosomático; 11-KT, 11-ketotestosterona; LS, lóbulo seminífero; ME, motilidad espermática; MIS, esteroide inductor de la maduración; OA, 11-ketoandrostenediona; RIA, radioinmunoensayo; 11-S (= 11-deoxicortisol), 17,21-dihidroxi-4-pregnen-3, 20-diona; SEM, error estándar de la media; Spd, espermátida; Sg, espermatogónia; Spz, espermatozoide; Ste, espermátocrito; TS, túbulo seminífero; V, cantidad total de esperma producido.

En teleósteos, el control endocrino de la espermatogénesis es menos conocido, aunque existen pruebas de que este proceso también está regulado por FSH, LH y T, pero también por la 11-ketotestosterona (11-KT), considerada el principal andrógeno en el testículo de teleósteos (Borg, 1994). La 11-KT es producida por las células intersticiales de Leydig en respuesta a gonadotropinas (Miura y Miura, 2003). Durante el último estadio del proceso espermatogénico (espermiación) se produce el fluido seminal, que es necesario para la capacitación de los Spz y para ayudarlos en su tránsito a través de los conductos seminales. Este proceso parece que es dependiente de esteroides C<sub>21</sub> (progestágenos), secretados también por las Lc (Nagahama, 1994; Miura y Miura, 2001; Vermeirssen et al, 2004). Un esteroide en particular que está implicado en el control de la espermiación en teleósteos es 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregnan-3-ona (17,20 $\beta$ P), que también participa en la maduración final de los oocitos en las hembras. Las concentraciones plasmáticas de este esteroide son elevadas durante el periodo de espermiación en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*; Baynes y Scott, 1985), el arenque (*Clupea harengus*; Carolsfeld et al., 1996; Scott et al., 1991), la platija del Norte (*Pleuronectes platessa*, Vermeirssen et al., 1998), y el fletan (*Hippoglossus hippoglossus*, Vermeirssen et al., 2000). En las últimas tres especies, más que ser el 17,20 $\beta$ P el esteroide que aumenta en plasma durante el proceso de espermiación, son sus metabolitos conjugados (sulfatados y glucuronidados). Estos metabolitos son 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,17,20-triol, 5 $\beta$ -pregnan-3 $\beta$ ,17,20-triol y 17,20 $\beta$ -dihidroxi-5 $\beta$ -pregnan-3-ona, y existe un ensayo capaz de cuantificar 17,20 $\beta$ P y sus metabolitos (combinando la concentración) en fluidos biológicos (Scott et al., 1997).

No obstante, en las gónadas de teleósteos también existen otros progestágenos. El más importante es 17,20 $\beta$ ,21-trihidroxi-4-pregnan-3-ona (20 $\beta$ S), el cual actúa como esteroide inductor de la maduración (MIS) en algunos teleósteos (Trant y Thomas, 1989). Este esteroide también es capaz de inducir la espermiación en *Acanthopagrus schlegeli* (Yueh y Chang, 1997), y parece unirse a un receptor específico de membrana estimulando la motilidad en *Micropogonias undulatus* (Thomas, 1999). Por otra parte, en el macho de *Limanda limanda*, es 17,20 $\alpha$ P el esteroide sugerido como MIS (Canario y Scott, 1991). En el fletan, 17,20 $\alpha$ P aumenta considerablemente en plasma tras el tratamiento con GnRH $\alpha$  (Vermeirssen et al., 2004). Finalmente, se ha demostrado que el esteroide 17,21-dihidroxi-4-pregnan-3,20-diona (deoxicortisol = 11S) es un producto mayoritario en ovarios de *Solea solea* (Canario, 1991).

El lenguado senegalés presenta testículos bilobulados más pequeños que otros peces planos; su índice gonadosomático (IGS) es  $\leq 0,1$ , y sólo muestra ligeros cambios remarcables a lo largo del ciclo reproductivo (García-López et al., 2005, 2006ab). En esta especie, la espermatogénesis parece ser de tipo semi-cístico: los Spc y las Spd son liberadas al lumen del LS, donde se transforman en Spz (García-López et al., 2005, 2006b). Este inusual modelo de espermatogénesis aparece asociado a la constante producción de pequeñas decenas de microlitros de esperma, con lo cual se observan machos espermiantes prácticamente durante todo el año (García-López et al., 2005, 2006b; Cabrita et al., 2006). Sin embargo, la reproducción en cautividad del lenguado se encuentra asociada a menudo con tasas de fertilización relativamente bajas (45-63%; Anguis y Cañavate, 2005) o a una ausencia

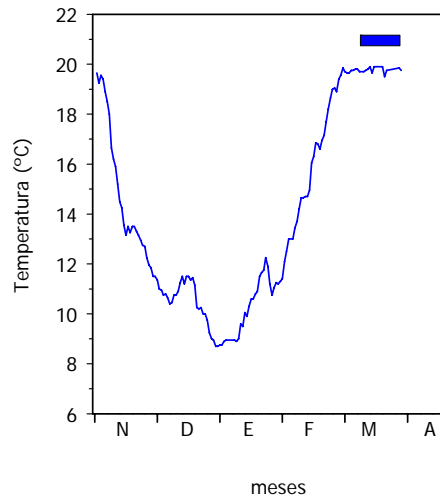
completa de fertilización en stocks de generación F1 tal y como se describe en el Capítulo 4.

En teleósteos, se ha descrito que la síntesis de 11-KT en testículos o en tejidos extra-testiculares, puede ocurrir a partir de pregnolona ( $P_5$ ) vía progesterona ( $P_4$ ),  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona ( $17P_4$ ), androstenediona ( $A_2$ ),  $11\beta$ -hidroxiandrostenediona (OHA) y 11-ketoandrostenediona (OA) (Mayer et al., 1990a; Goos y Consten, 2002). De acuerdo con esto, machos castrados implantados con OA muestran elevados niveles plasmáticos de 11-KT (Mayer et al., 1990b; Borg et al., 1993), y el tratamiento en machos intactos con ambas OA y 11-KT puede promover el desarrollo testicular (Goos y Consten, 2002). En base a estos datos, en este capítulo se ha investigado si el tratamiento de machos de lenguado senegalés con GnRH $\alpha$  en combinación con OA es capaz de aumentar los niveles plasmáticos de esteroides sexuales, y estimular el desarrollo de las células germinales y la producción de espermatozoides.

## 5.2. Material y Métodos

### 5.2.1. Animales y tratamientos hormonales

Individuos adultos, generación F1 (de 1-1,5 años de edad), fueron criados y estabulados en cautividad como se ha descrito en anteriores capítulos.



**Fig. 5.1.** Temperatura media diaria del agua. Las barras gruesas en azul indican el periodo durante el cual se administraron los tratamientos hormonales.

Aproximadamente cinco meses antes de comenzar los tratamientos hormonales, individuos macho ( $0,79 \pm 0,03$  kg de peso) fueron sometidos a un régimen de temperatura controlada (Fig. 5.1.). Este régimen consistió en una disminución progresiva de la temperatura desde  $19,5^{\circ}\text{C}$  a  $8,5^{\circ}\text{C}$ , seguido de un aumento progresivo hasta  $19,5\text{-}20^{\circ}\text{C}$ . De este modo, los animales fueron mantenidos a temperaturas inferiores a  $10^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 3 semanas. Tras este tratamiento, y cuando la temperatura de los tanques ya era estable a  $19,5\text{-}20^{\circ}\text{C}$  (durante dos semanas en el mes de marzo), los animales fueron tratados con un único implante de etileno vinilo acetato (EVAc; Mylonas y Zohar, 2001) conteniendo salino (control) ó  $50 \mu\text{g}$  GnRHa/kg con o sin otro implante con 2 ó 7 mg OA/kg (Sigma-Aldrich, España). Los machos fueron distribuidos en ocho tanques (dos tanques por tratamiento;  $n = 3$  machos por tanque).

5.2.2. Determinación de los niveles de esteroides sexuales en plasma y testículo

Antes de administrar el tratamiento hormonal y semanalmente a partir de ese momento, los machos fueron sedados con 500 ppm de 2-fenoxietanol (Acros Organics, USA), y aproximadamente 0,5 ml de sangre fue extraída de la vena caudal con una jeringa heparinizada, centrifugada, y el plasma congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

Los niveles plasmáticos de T y 11-KT se determinaron mediante un kit comercial como se ha descrito anteriormente. Los coeficientes de variación (CV) inter-ensayo fueron 1,9% para T (n= 6), y 2,7% para 11-KT (n= 6). Los CV intra-ensayo (calculados a partir de los duplicados de las muestras) fueron  $2,8\pm 0,2\%$  para T (n= 6), y de  $10,0\pm 1,5\%$  para 11-KT (n= 6). La reacción cruzada del anticuerpo anti-11-KT con OA fue de 0,01% (según datos del fabricante). Los niveles plasmáticos de 11-KT determinados por ELISA (“Enzim-linked Immunosorbent Assay”) fueron confirmados por radioinmunoensayo (RIA) siguiendo el protocolo de Scott et al., (1984) (datos no mostrados).

Para la determinación de los niveles circulantes libres de esteroides  $\text{C}_{21}$ , 17,20 $\beta$ P, 17,20 $\alpha$ P, 20 $\beta$ S y 11-S, una alícuota de plasma (100  $\mu\text{l}$ ) fue mezclada con 400 $\mu\text{l}$  de agua destilada y 4 ml de dietil-eter. Los tubos se dejaron reposar y la fase acuosa fue separada por congelación en nitrógeno líquido. El dietil-eter fue vertido en tubos de vidrio nuevos y evaporado en baño maría a  $45^{\circ}\text{C}$ . El residuo fue entonces reconstituido en 1 ml de solución de ensayo y su concentración determinada por RIA (Scott et al., 1984, 1991; Scott y Sorensen, 1994). Otra alícuota de plasma (20  $\mu\text{l}$ ) fue sometida a solvolisis ácida toda la noche a  $45^{\circ}\text{C}$  usando una mezcla de etil-acetato y ácido

trifluoroacético (100:1,4; v:v). Tras evaporar el solvente, el residuo fue redissuelto en 1 ml de solución de ensayo y la concentración conjunta de 17,20βP y sus metabolitos 5β-reducidos cuantificada usando como estándares 5β-pregnane-3α,17,20β-triol (Scott et al., 1997).

Las concentraciones de 17,20βP libre en las muestras de testículo recogidas tras sacrificar los machos al final del experimento también fueron cuantificadas por RIA. Para este análisis, las piezas de testículo (102±6 mg) fueron homogenizadas en 400 μl de tampón RIA, incubadas a 60°C durante 30 min en baño maría y centrifugadas a 6000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos de cristal y se añadió el mismo volumen de solución de ensayo (dilución 1:2). El análisis se llevó a cabo a partir de duplicados de 100 μl de esta dilución siguiendo el mismo protocolo que para las muestras de plasma. El contenido de agua de cada testículo fue estimado gravimétricamente hasta peso constante a 60°C usando otra pieza del mismo testículo.

### 5.2.3. Análisis histológico

Tras las cuatro semanas de tratamiento hormonal, los machos fueron sacrificados mediante anestesia y sección de la médula espinal. Los testículos fueron extraídos y pesados, y el índice gonadosomático (IGS: peso de las gónadas/peso corporal x 100) calculado. Una pieza de testículo de cada macho fue fijada en solución de Bouin modificada (75% ácido pícrico y 25% formalina) durante 2 h, deshidratada, incluida en paraplást (Sigma-Aldrich), seccionada a 5 μm y teñida con eosina/hematoxilina.

La abundancia de LS, así como de células germinales y somáticas en la corteza de los testículos fijados fue evaluada mediante examinación mi-



croscópica usando un microscopio óptico Leica DMLB. El número de LS y de clusters de Lc por  $\text{mm}^2$ , así como el número de Lc por cluster, fue determinado en 5 secciones transversales diferentes de la corteza testicular en cada macho. El número de Sc, SgA, SgB, SpcI, SpcII y Spd, fue contabilizado en al menos cinco LS de cada sección. Para determinar el número de Spz, el número de células por TS también se contabilizó en al menos cinco TS diferentes por sección.

#### 5.2.4. Determinación de la densidad y motilidad espermática

Para evitar el stress que se ocasiona a los individuos, la cantidad total de espermatozoides producidos (V), la densidad espermática (DE), la motilidad espermática (ME), y la duración de la motilidad espermática (DME), fueron determinadas directamente a partir de los testículos tras sacrificar a los individuos al final del experimento. El espermatozoides fue recogido a partir del testículo dorsal completo, tras ser seccionado en dos partes y aplicar una suave presión; el volumen de espermatozoides fue entonces recogido y medido con una micropipeta. Con este método, se obtiene espermatozoides libre de orina, y por lo tanto se puede determinar de un modo más fiable el volumen total de espermatozoides. La DE fue determinada en dilución 50 a 100 en solución inmovilizadora de espermatozoides ( $\text{NaCl}$  150 mM,  $\text{KCl}$  15,2 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,3 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,6 mM; tamponado con  $\text{NaHCO}_3$ - $\text{NaOH}$  5 mM a pH 8,2) y cuantificada en cámara Neugebauer bajo microscopio óptico Leica DMLB. Para medir la DME, las muestras de espermatozoides fueron diluidas 10 veces en agua de mar filtrada sobre un porta, y situado éste bajo el microscopio a 200 aumentos. La DME fue definida como el intervalo de tiempo desde la activación hasta el cese del movimiento de los Spz (Lim et al., 2004). La morfología de los Spz fue determinada sobre una muestra de espermatozoides diluida 1:1.000 en tampón inmo-

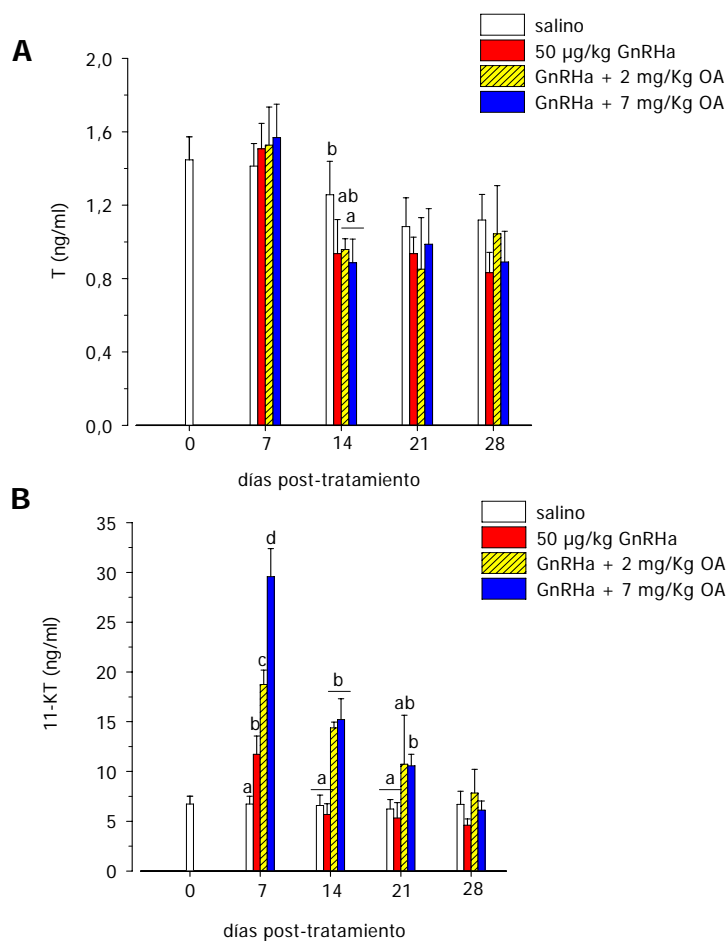
vilizador de esperma. El diámetro y longitud de la cabeza y la cola, respectivamente, fueron medidos en al menos 15 Spz por macho utilizando un analizador de imágenes (AnalySIS, SIS GmbH, Alemania).

#### 5.2.5. Análisis estadístico

Los datos están expresados como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM). Los datos fueron estadísticamente analizados con análisis de varianza (ANOVA) de uno o dos factores, tras la transformación logarítmica de los datos cuando fue necesario, seguido del test de múltiple-rango de Tukey o el test de comparación de Kruskal-Wallis (Cobb, 1998). El nivel de significancia fue fijado en  $P < 0,05$ .

### 5.3. Resultados

Para investigar si el tratamiento con OA puede aumentar el efecto de GnRHa sobre la espermatogénesis en el lenguado senegalés, machos previamente sometidos a un régimen de temperatura controlada fueron tratados con un único implante de EVAc conteniendo salino (control) ó 50  $\mu$ g GnRHa/kg, con o sin otro implante de 2 ó 7 mg OA/kg. Los niveles plasmáticos de T y 11-KT fueron determinados semanalmente (Fig. 5.2.). La T en plasma no se incrementó hasta el día siete de tratamiento con GnRHa, disminuyendo a partir del día catorce en los tres grupos tratados con GnRHa (Fig. 5.2.A). En los machos control, la T plasmática disminuyó una semana después, en el día veintiuno, alcanzando a partir de ese día valores similares entre todos los grupos tratados. Por el contrario, una semana después del inicio de los tratamientos hormonales, los niveles plasmáticos de 11-KT en

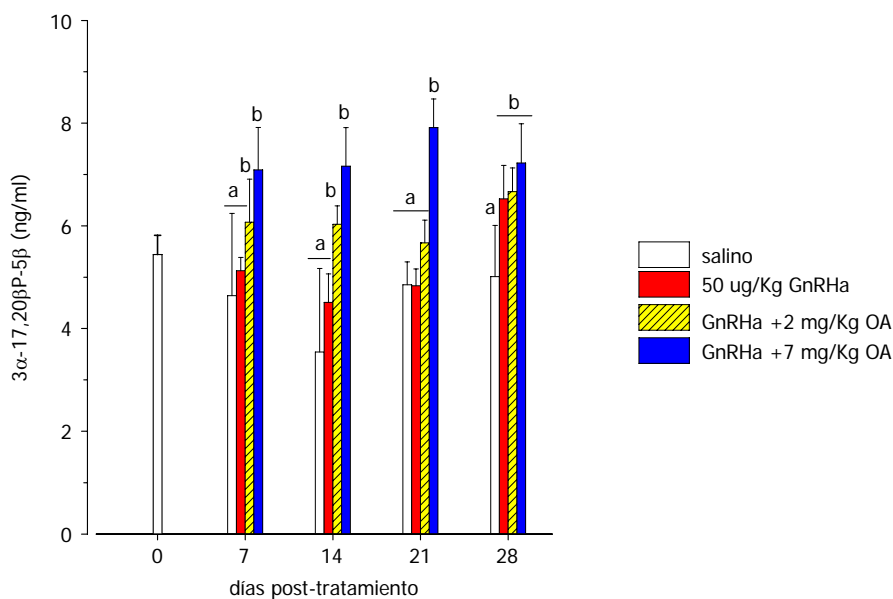


**Fig. 5.2.** Concentraciones plasmáticas de T (**A**), y 11-KT (**B**) en machos tratados con salino o con GnRHα (50 µg/kg) en combinación con diferentes dosis de OA (2 ó 7 mg/kg). Los valores corresponden a la media ± SEM ( $n = 4-6$  machos). Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA;  $P < 0,05$ ).

los machos implantados con GnRHα, tratados o no con OA, aumentaron significativamente ( $P < 0,05$ ) respecto a los machos control (Fig. 5.2.B). En cambio, los machos tratados con GnRHα+OA mostraron niveles plasmáticos de 11-KT mayores ( $P < 0,05$ ) que los machos implantados sólo con GnRHα,

siendo la mayor concentración de 11-KT en los machos tratados con GnRHa + 7 mg OA/kg. A partir del día catorce, la cantidad de 11-KT plasmática en machos implantados sólo con GnRHa volvió a valores similares a los controles, mientras que los dos grupos tratados con GnRHa+OA todavía mostraban valores de 11-KT más elevados ( $P < 0,05$ ), aunque estos comenzaban a disminuir con respecto a los valores en el día siete (Fig. 5.2.B). Durante las siguientes semanas, las concentraciones de 11-KT en plasma de los machos tratados con GnRHa+OA disminuyeron progresivamente, y en el día 28 eran ya similares entre todos los grupos experimentales.

Para averiguar si el tratamiento con GnRHa+OA podía aumentar la producción de esteroides  $C_{21}$  potencialmente implicados en la maduración del espermatozoide, los niveles plasmáticos de 17,20 $\beta$ P, 17,20 $\alpha$ P, 11-S, 20 $\beta$ S, 17,20 $\beta$ P libre+sulfatada, así como sus metabolitos 5 $\beta$ -reducidos fueron también analizados. Independientemente del tratamiento hormonal, los niveles plasmáticos de 17,20 $\beta$ P, 17,20 $\alpha$ P, 11-S y 20 $\beta$ S fueron inferiores a 1 ng/ml durante todo el periodo experimental (datos no mostrados). En el caso de 17,20 $\beta$ P por ejemplo, el 43% de las muestras correspondían a valores entre 0,2-0,9 ng/ml y el 57% eran inferiores a 0,2 ng/ml. Además, al no encontrar diferencias estadísticas entre los grupos, se decidió innecesario reensayar las muestras bajo condiciones más sensibles. En cambio, los niveles plasmáticos de metabolitos 5 $\beta$ -reducidos (libres + conjugados) de 17,20 $\beta$ P sí fueron detectables en la mayoría de machos, y de hecho, aumentaron de manera significativa a lo largo del experimento (Fig. 5.3.). Así, el grupo tratado con GnRHa + 7 mg OA mostró un aumento progresivo ( $P < 0,05$ ) de los niveles plasmáticos de los metabolitos 5 $\beta$ -reducidos, libres + conjugados de 17,20 $\beta$ P a partir del séptimo día en adelante, mientras que en



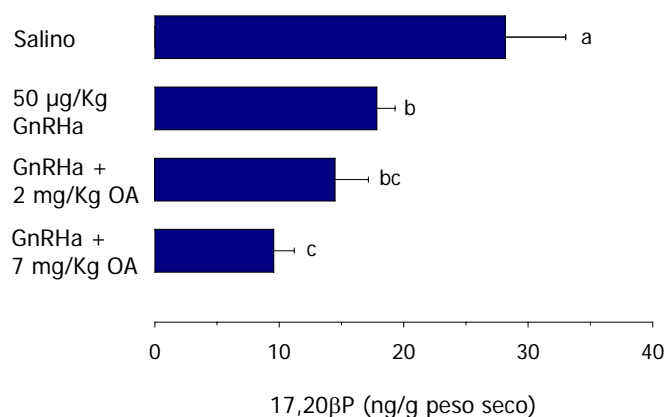
**Fig. 5.3.** Cambios en las concentraciones plasmáticas de 17,20βP libre + sulfatada (estandarizada con 5β-pregnona-3α-17,20βtriol; 3α-17,20βP-5β) en machos tratados con salino o con GnRHa (50 μg/kg) en combinación con diferentes dosis de OA (2 ó 7 mg/kg). Los valores corresponden a la media ± SEM (n= 4-6 machos). Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA;  $P < 0,05$ ).

los grupos tratados sólo con GnRHa y con GnRHa + 2 mg OA/kg, estos metabolitos sólo aumentaron significativamente ( $P < 0,05$ ) a partir del día veintiocho, alcanzando valores de concentración muy similares a los del grupo GnRHa + 7 mg OA/kg. Los valores en plasma de metabolitos libres + sulfatados de 17,20βP del grupo control no mostraron variaciones a lo largo del experimento.

Las observaciones previas sugerían que 17,20βP podría estar produciéndose en los testículos, siendo rápidamente sulfatada y probablemente metabolizada hasta el punto de ser prácticamente no medible en el plasma.

Para verificar esta hipótesis, el contenido de  $17,20\beta\text{P}$  en los testículos al final del experimento fue analizado (Fig. 5.4.). Los resultados indican que los machos control tenían concentraciones de  $17,20\beta\text{P}$  en testículo de  $28,2\pm 4,8$  ng/g de peso seco ( $n = 6$ ), aproximadamente 28 veces mayores que en plasma. Sin embargo, los tres grupos de machos tratados con GnRH $\alpha$  tenían concentraciones de  $17,20\beta\text{P}$  en testículo menores ( $P < 0,05$ ) que los controles, siendo los machos tratados con GnRH $\alpha$  + 7 mg OA/kg los que mostraron la menor cantidad de  $17,20\beta\text{P}$  ( $10,3\pm 1,8$  ng/g de peso seco;  $n = 6$ ). Estos datos indicaron la existencia de una correlación inversa entre el contenido de  $17,20\beta\text{P}$  libre en testículo y la concentración de metabolitos  $5\beta$ -reducidos, libres + conjugados, de  $17,20\beta\text{P}$  en plasma.

El efecto de los diferentes tratamientos sobre la espermatogénesis fue evaluado mediante el examen histológico del área cortical de los testículos (Tabla 5.1.). En esta área se localizan las células germinales, mientras que la región medular contiene el sistema de conductos eferentes que recogen y almacenan el esperma (García-López et al., 2005). El análisis histológico reveló que los valores de IGS se mantuvieron similares antes y después del tratamiento. Sin embargo, aunque los machos de todos los grupos experimentales mostraron producción de esperma el día 28, se observaron diferencias en la proporción de Lc y en la progresión de la espermatogénesis. El tratamiento con GnRH $\alpha$ , independientemente de la presencia de OA, aumentó el número de LS por área de testículo, y esto estuvo asociado con un aumento del número de clusters de Lc, con lo cual la ratio entre LS y clusters de Lc no presentó variaciones entre tratamientos. Sin embargo, el número de Lc por cluster sí aumentó significativamente ( $P < 0,05$ ) en el testículo de machos tratados con 7 mg OA/kg con respecto a los tratados sólo con



**Fig. 5.4.** Cambios en el contenido de 17,20βP en el testículo de machos tratados con salino o GnRHα (50 μg/kg) en combinación con diferentes dosis de OA (2 ó 7 mg/kg). Los valores corresponden a la media ± SEM (n= 4-6 machos). Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA;  $P < 0,05$ ).

GnRHα o a los tratados con salino. La espermatogénesis parece haber sido estimulada en todos los grupos tratados con GnRHα, ya que el porcentaje de SgB, SpcI y Spd en los testículos de los machos de estos tratamientos fue significativamente mayor ( $P < 0,05$ ) que en el grupo control. Los machos implantados con 7 mg OA/kg mostraron el estado de espermatogénesis más avanzado, tal como indica la menor proporción de SgB y SpcI y la mayor proporción de Spd por LS en sus testículos. De acuerdo con el efecto estimulador de GnRHα sobre la espermatogénesis, el número de Spz por TS fue mayor en los machos tratados sólo con GnRHα o en combinación con 2 mg OA/kg que en los machos control. Sin embargo, los machos tratados con GnRHα + 7 mg OA/kg mostraron la misma cantidad de Spz por TS que los machos control.

Seguidamente al sacrificio de los machos y a la extracción de sus testículos al final del experimento, la producción de esperma de cada grupo

**Tabla 5.1.** Efecto de GnRH $\alpha$  (50  $\mu$ g/kg) en combinación con OA sobre el desarrollo de células somáticas y germinales en testículos de lenguado senegalés

	Día 0	Día 28			
		Salino	GnRH $\alpha$ + OA (mg/kg)		
			0	2	7
<i>n</i>	3	6	6	4	6
IGS	0,07 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,01
LS/mm <sup>2</sup>	215 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	203 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	350 $\pm$ 21 <sup>b</sup>	319 $\pm$ 27 <sup>b</sup>	323 $\pm$ 16 <sup>b</sup>
CLc/mm <sup>2</sup>	55 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	70 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	129 $\pm$ 11 <sup>b</sup>	128 $\pm$ 14 <sup>b</sup>	112 $\pm$ 7 <sup>b</sup>
CLc/LS	0,3 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,0
Lc/C	8,2 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>	8,8 $\pm$ 0,4 <sup>ab</sup>	7,7 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	9,8 $\pm$ 0,3 <sup>bc</sup>	11,2 $\pm$ 0,7 <sup>c</sup>
Sc/LS	1,3 $\pm$ 0,6	0,8 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2
SgA (%)	2,0 $\pm$ 1,0	0,8 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,8	3,9 $\pm$ 1,6	0,6 $\pm$ 0,4
SgB (%)	14,0 $\pm$ 4,5 <sup>a</sup>	12,2 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	6,1 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>	6,5 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>	1,5 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>
Spcl (%)	19,5 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	23,6 $\pm$ 4,2 <sup>a</sup>	12,6 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>	8,0 $\pm$ 1,7 <sup>b</sup>	2,9 $\pm$ 1,3 <sup>c</sup>
SpcII (%)	0	0,5 $\pm$ 0,2	0	0	0
Spd (%)	52,4 $\pm$ 13,3 <sup>a</sup>	61,2 $\pm$ 5,6 <sup>a</sup>	80,0 $\pm$ 4,8 <sup>b</sup>	81,6 $\pm$ 4,6 <sup>b</sup>	96,0 $\pm$ 1,7 <sup>c</sup>
Spz/TS	0	40 $\pm$ 8 <sup>a</sup>	102 $\pm$ 33 <sup>b</sup>	81 $\pm$ 27 <sup>b</sup>	25 $\pm$ 9 <sup>a</sup>

Los valores fueron calculados sólo a partir del área cortical. Para las células somáticas, los valores indican el número de LS por mm<sup>2</sup> (LS/ mm<sup>2</sup>), número de clusters de Lc por mm<sup>2</sup> (CLc/mm<sup>2</sup>), número de clusters de Lc por LS (CLc/LS), número de Lc por cluster (Lc/C), y número de Sc por LS (Sc/LS). Para las SgA, SgB, Spcl, SpcII, y Spd, se indica el porcentaje de cada tipo celular por LS. Para los Spz, se indica el número de células por TS (Spz/ TS).

Valores dentro de una misma fila con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

fue evaluada (Tabla 5.2.). El tratamiento sólo con GnRH $\alpha$  o en combinación con la menor dosis de OA aumentó significativamente ( $P < 0,05$ ) la producción de esperma respecto de los machos control. Ya que no se encontraron diferencias en la densidad del esperma entre tratamientos, la producción de Spz en estos grupos parece incrementada, de acuerdo con lo observado anteriormente en el análisis histológico. Por el contrario, los machos implan-



tados con GnRH $\alpha$  + 7 mg OA/kg mostraron volúmenes menores de esperma en testículo, siendo su cantidad similar a la encontrada en los controles. Sin

**Tabla 5.2.** Efecto de GnRH $\alpha$  (50  $\mu$ g/kg) con o sin OA sobre la producción y la motilidad del esperma en el lenguado senegalés

	Salino	GnRH $\alpha$ + OA (mg/kg)		
		0	2	7
<i>n</i>	6	6	4	6
Machos espermiantes	6	6	4	5
Peso seco (g)	0,33 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,06	0,26 $\pm$ 0,04
Volumen de esperma ( $\mu$ l/g peso seco)	13,1 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	33,1 $\pm$ 5,5 <sup>b</sup>	40,1 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>	11,1 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>
DE (x 10 <sup>9</sup> /ml)	4,6 $\pm$ 1,2	2,8 $\pm$ 0,6	3,5 $\pm$ 1,9	2,3 $\pm$ 1,5
DME (seg)	241 $\pm$ 29 <sup>a</sup>	232 $\pm$ 14 <sup>a</sup>	450 $\pm$ 53 <sup>b</sup>	486 $\pm$ 51 <sup>b</sup>

Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM. Antes del experimento no se observó producción de esperma. Los valores en una misma fila con diferente superíndice son estadísticamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

embargo, la determinación de la motilidad de los Spz tras su activación con agua de mar reveló que ambos grupos tratados con OA producían Spz aproximadamente dos veces más motiles que los producidos por el grupo control y por los tratados sólo con GnRH $\alpha$ . El diámetro de la cabeza y la longitud de la cola de los Spz, no obstante, no fue diferente entre los diferentes grupos (datos no mostrados).

### 5.3. Discusión

El tratamiento de peces planos con GnRHa generalmente aumenta la concentración de andrógenos en plasma (Harmin y Crim, 1993; Vermeirssen et al., 1998, 2000; Pankhurst y Poortenaar, 2000; Moon et al., 2003; Capítulo 4), esteroides C<sub>21</sub>, la hidratación del esperma (Vermeirssen et al., 1998, 2004; Martin-Robichaud et al., 2000; Tvedt et al., 2001; Moon et al., 2003; Lim et al., 2004) y/o la motilidad de los Spz (Clearwater y Crim, 1998; Vermeirssen et al., 2004). Sin embargo, en la generación F1 de lenguado senegalés, así como en otras especies, GnRHa es aparentemente inefectivo a la hora de incrementar la producción de esperma, incluso aunque la concentración de andrógenos en plasma sí aumente tras el tratamiento (p.e. Berlinsky et al., 1996, 1997; Capítulo 4). Una disfunción reproductiva así podría deberse a una desconexión del proceso de espermatogénesis y/o del de espermiación tras un largo periodo en cautividad. Una situación similar se observa en la platija del Norte, donde los machos en condiciones de cautividad suelen tener un esperma anormalmente denso y unas concentraciones de esteroides sexuales de hasta 100 veces inferiores (Vermeirssen et al., 1998) a las observadas en individuos salvajes (Scott y Vermeirssen, 1995).

En este trabajo, los machos fueron mantenidos bajo un régimen de temperatura controlada y por debajo de 10°C durante aproximadamente 3 semanas en invierno (Fig. 5.1.). Bajo estas condiciones de temperatura, el análisis histológico demostró que el tratamiento con GnRHa es capaz de promover ligeramente la espermatogénesis y aumentar la producción de esperma, mientras que la hidratación parece no ser afectada (Tablas 5.1. y 5.2.). Estas observaciones podrían estar indicando que las bajas temperaturas durante el momento de la recrudescencia testicular pueden beneficiar el pro-

ceso de espermatogénesis en el lenguado senegalés. Sin embargo, el tratamiento con GnRHa fue aplicado en este estudio en machos con un desarrollo testicular diferente al de los machos empleados en los experimentos anteriores (Capítulo 4), y por tanto, estas diferencias podrían explicar un efecto distinto del GnRHa sobre el proceso de espermatogénesis y de espermiación. Este punto deberá ser investigado con más detalle en el futuro.

Con el fin de aumentar el efecto de GnRHa sobre la producción de esperma, esta hormona fue aplicada en combinación con OA, la cual es un precursor inmediato de la biosíntesis de 11-KT a través de su conversión por el enzima  $17\beta$ -hidroxi-esteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD) presente en testículo y otros tejidos en peces (Mayer et al., 1990a; Schulz y Blüm, 1991). En humanos, así como en el ratón y en rata, se ha demostrado recientemente que la reducción de androstenediona a testosterona es catalizada por el enzima  $17\beta$ -HSD de tipo 3, y se ha demostrado que OA es el sustrato de este enzima no sólo en el pez cebra (*Danio rerio*) sino también en humanos (Mindnich et al., 2005). Según estas observaciones, se puede hipotetizar que la administración de GnRHa+OA en machos puede resultar en una fuente adicional de 11-KT, independiente de la estimulación gonadotrópica y de los mecanismos reguladores a nivel cerebro-hipófisis, que podría potenciar la estimulación de la espermatogénesis por parte de GnRHa. De modo consistente con esta hipótesis, los machos tratados con GnRHa+OA mostraron un incremento de los niveles plasmáticos de 11-KT más fuerte y sostenido que los machos tratados sólo con GnRHa (Fig. 5.2.B). De esta manera, los machos tratados con GnRHa y la dosis más alta de OA (7 mg/kg) mostraron más Lc por cluster y una mayor proporción de Spd por LS en el testículo que los machos tratados sólo con GnRHa (Tabla 5.1.). Estos datos demuestran que el tratamiento con GnRHa+OA efectivamente acelera el proceso esper-

matogénico en el lenguado senegalés, aunque permanece por ser demostrado si OA administrado sin GnRH $\alpha$  es capaz también de producir el mismo estímulo por sí mismo. De todas formas, un dato muy interesante es que OA disminuyó el volumen de esperma pero aumentó casi aproximadamente al doble la motilidad de los Spz (Tabla 5.2.). Por lo tanto, estos datos indican que la aceleración de la espermatogénesis por OA podría estar asociada con la producción de Spz más capacitados, y de este modo, más motiles. Esta situación podría ser similar a la que se ha observado en la anguila europea (*Anguilla anguilla*), donde la motilidad de los Spz aumenta aproximadamente un mes tras el tratamiento con hormona coriónica humana (Pérez et al., 2000).

La estimulación de la espermatogénesis y la motilidad espermática por OA podría no deberse a un efecto directo de ésta, sino al aumento en la producción de esteroides C<sub>21</sub> que son los candidatos más adecuados a ser hormonas inductoras de la espermiación (Baynes y Scott, 1985; Yueh y Chang, 1997; Thomas, 1999; Vermeirssen et al., 2000; Miura y Miura, 2003). Para investigar este punto se determinaron los niveles plasmáticos de varios esteroides C<sub>21</sub>, como 17,20 $\beta$ P, 17,20 $\alpha$ P y 20 $\beta$ S, los cuales están potencialmente relacionados con el proceso de espermiación en el lenguado senegalés. Sin embargo, los niveles plasmáticos de estas hormonas en estado libre, así como de 11-S, resultaron ser indetectables (< 0,2 ng/ml). Al igual que los datos obtenidos por García-López et al. (2006ab), la concentración en plasma de 17,20 $\beta$ P fue detectada en plasma a niveles inferiores a 1 ng/ml (aunque en nuestro trabajo, 17,20 $\beta$ P estuvo por debajo de 0,2 ng/ml en más del 50% de los machos analizados). Considerando ambos trabajos, sería cuestionable si aquello que estamos cuantificando por RIA es de hecho

17,20 $\beta$ P. A estos niveles tan bajos de cuantificación, tan próximos al límite de detección de la técnica (1,9 pg/ml), existe la posibilidad de estar cuantificando componentes no específicos.

En contraste con las concentraciones libres de 17,20 $\beta$ P, los niveles de 17,20 $\beta$ P libre + sulfatada y sus metabolitos, no sólo resultaron detectables, sino que además resultaron ser más elevados en machos tratados con GnRHa+OA que en el resto de los grupos durante las primeras dos semanas de experimento (Fig. 5.3.). El aumento de los metabolitos de 17,20 $\beta$ P en el plasma de lenguado después del tratamiento con GnRHa fue sin embargo menor (< doble) en comparación con los que se han observado en la platija y el fletan (> 100 veces mayores) (Vermeirssen et al., 1998, 2004). Esta disparidad podría ser debida a la diferencia de IGS que existe entre estas especies, ya que los testículos del lenguado senegalés son de un tamaño muy pequeño (aproximadamente 0,07% de la masa total del cuerpo; García-López et al., 2005, 2006ab; Tabla 5.1.). No obstante, las concentraciones libres + sulfatadas de 17,20 $\beta$ P y sus metabolitos mostraron una correlación negativa respecto a las concentraciones de 17,20 $\beta$ P en el testículo (Fig. 5.4.), lo que sugiere, aunque no demuestra, que los andrógenos podrían estimular la conjugación y metabolización de 17,20 $\beta$ P en testículo.

El lenguado senegalés podría representar una de las especies en las cuales, aparentemente, 17,20 $\beta$ P puede no estar relacionada con la espermiación, ya que este esteroide o no se ha podido cuantificar, o está presente en concentraciones muy bajas y constantes a lo largo del ciclo reproductor (García-López et al., 2006ab; este trabajo). Sin embargo, en línea con datos provenientes de otras especies, como la platija del Norte (Scott et al., 1997; Inbaraj et al., 1997; Vermeirssen et al., 1998), el lenguado de invierno (*Pleu-*

*ronectes americanus*; Canario, 1991), el fletan del Atlántico (Vermeirssen et al., 2000, 2004) y el pez ayu (*Plecoglossus altivelis*; Suzuki et al., 1981), 17,20 $\beta$ P está muy probablemente producida en los testículos, pero no se puede cuantificar en plasma debido a su rápida transformación en 17,20 $\beta$ P sulfatada o glucoronidada y/o reducida a sus metabolitos 5 $\beta$ . La presencia de estos metabolitos en el plasma de los machos de lenguado refuerza la idea de que 17,20 $\beta$ P puede jugar un papel muy importante en el proceso de espermiación, como ya ha sido sugerido (García-López et al., 2006b). La cuestión que todavía no ha sido resuelta, no obstante, es si estos metabolitos tienen algún tipo de función fisiológica por sí mismos. En favor de esta idea, existe el hecho de que en el macho de la platija del Norte, el metabolito 3 $\beta$ -17,20 $\beta$ P-5 $\beta$  es equipotente a 17,20 $\beta$ P para unirse a su receptor putativo y estimular la hidratación del espermatozoide (Mugnier et al., 1999).

En conclusión, en este trabajo hemos mostrado que el tratamiento de machos adultos de lenguado senegalés con GnRH $\alpha$  en combinación con OA incrementa los niveles circulantes de 11-KT y de 17,20 $\beta$ P libre+sulfatada, así como sus metabolitos 5 $\beta$ -reducidos. De modo remarcable, este tratamiento aceleró el proceso de espermatogénesis y la motilidad espermática, aunque disminuyó el volumen de espermatozoide producido. Así, aunque se requieren estudios adicionales para identificar los mecanismos de acción de los esteroides sexuales en el testículo del lenguado senegalés, este trabajo sugiere que el tratamiento de GnRH $\alpha$ +OA puede ser utilizado como una terapia hormonal para mejorar algunas disfunciones reproductoras de los machos de esta especie en condiciones de cautividad.



## **RESUMEN**





**RESUMEN****Capítulo 2. Caracterización molecular del receptor de vitelogenina (VtgR) y de la proteína de unión a ácidos grasos 11 (FABP11) en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*)**

Se han aislado y caracterizado los ADNc completos codificantes de la proteína de unión a ácidos grasos 11 (FABP11) y dos isoformas del receptor de lipoproteínas de muy baja densidad/vitelogenina (VtgR), una de ellas con el dominio de unión a azúcares (VtgR+), y otra sin él (VtgR-). El estudio filogenético sugiere que FABP11 pertenece a un nuevo grupo relacionado con FABP3 y FABP7. EL análisis de expresión mediante la reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR), revela elevados niveles de los dos transcritos de *vtgr* en el ovario de lenguado, y en menor grado, en tejidos somáticos. El ARNm de *fabp11* se expresa fuertemente en ovario, hígado y tejido adiposo, y también se detectan niveles bajos en corazón, músculo, riñón y testículo. El análisis mediante hibridación in situ sobre ovarios en diferentes estadios de desarrollo, mostró elevados niveles del ARNm de *vtgr* y *fabp11* en oocitos previtelogénicos, mientras que no se detectó ningún tipo de señal en oocitos vitelogénicos. La expresión de *fabp11* se detectó solamente en las células somáticas que envuelven los oocitos (células de la granulosa y de la teca), y parecía ser elevada en folículos atrésicos. La cuantificación de ambos transcritos mediante RT-PCR cuantitativa (qPCR) indicó que la acumulación de *vtgr* y *fabp11* en el ovario muestra una correlación positiva con el porcentaje de folículos en previtelogénesis y atresia, respectivamente. Estos resultados sugieren que los niveles de expresión de *vtgr* pueden ser empleados como marcadores funcionales para cuan-

tificar el número de oocitos reclutados en vitelogénesis. Asimismo, el ARNm de *fabp11* puede ser útil como marcador molecular para determinar procesos celulares y factores medioambientales que regulan la atresia folicular en el lenguado y en otros peces teleósteos.

### **Capítulo 3. Estudio del proceso de vitelogénesis en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) durante el ciclo reproductor**

En este estudio, se ha desarrollado un ELISA competitivo para la cuantificación de vitelogenina (Vtg) en plasma de lenguado senegalés. Dicho ensayo se ha basado en la utilización de Vtg de lenguado purificada por cromatografía en columna y liofilizada, y un anticuerpo comercial específico anti-Vtg de *Solea senegalensis*. La pureza de la Vtg purificada, obtenida a partir de machos de lenguado tratados con  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) se analizó mediante SDS-PAGE. La sensibilidad del ELISA al 90% de unión fue de 1,72 ng/pocillo (171,69 ng/ml), el coeficiente de variación (CV) inter-ensayo al 50 % de unión fue de  $1,44\pm 0,69$  % ( $n=2$ ), y el CV intra-ensayo (calculado a partir del duplicado de las muestras) fue  $4,27\pm 1,88$  % ( $n=2$ ). Los niveles de Vtg y  $E_2$  en plasma de hembras de lenguado durante el ciclo reproductor bajo condiciones naturales de temperatura y fotoperiodo fueron cuantificados. Las hembras mostraron los niveles más altos de Vtg ( $438,58\pm 82,27$   $\mu\text{g/ml}$ ) y  $E_2$  ( $6,56\pm 2,52$  ng/ml) en plasma entre dos y tres meses antes del periodo de puesta, momento en que se observa un aumento del IGS y un incremento del porcentaje de oocitos vitelogénicos en ovario. La acumulación del ARNm de *vtgr*, determinada mediante qPCR, mostró unas variaciones opuestas, ya que su expresión disminuyó al aumentar el porcentaje de

oocitos vitelogénicos. Estos datos indican que el ELISA desarrollado para el lenguado senegalés es válido para determinar las variaciones estacionales relativas de Vtg en hembras. Los resultados de la expresión de *vtgr*, junto con las observaciones realizadas en el capítulo 2, sugieren que la transcripción de este gen ocurre principalmente durante los estadios iniciales de desarrollo ovárico, justo antes de que el receptor sea necesario para la captación de la Vtg plasmática y el inicio del crecimiento oocitario.

**Capítulo 4. Inducción a la puesta en cautividad del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*).**

En este capítulo se ha investigado la efectividad del tratamiento con un análogo de la hormona liberadora de las gonadotropinas, [D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>, NEt] GnRHa (GnRHa), para inducir la puesta o la espermiación de hembras y machos de lenguado, respectivamente. En este estudio se han comparado dos métodos de administración de GnRHa: inyección intramuscular o colocación de implantes con liberación sostenida de GnRHa.

Los animales fueron tratados con GnRHa durante la primavera (abril-mayo) o el otoño (octubre), que son las estaciones del año durante las cuales se produce la reproducción del lenguado. Durante la primavera, las hembras inyectadas con una dosis de 5 µg GnRHa/kg tres veces por semana, o tratadas con un único implante cargado con GnRHa (50 µg/kg) mostraron múltiples ovulaciones y puestas durante un periodo aproximado de 30 días. Las concentraciones plasmáticas de 17β-estradiol (E<sub>2</sub>) en las hembras fueron elevadas a partir del día 7 post-tratamiento, precediendo a las puestas con mayor producción de huevos, al mismo tiempo que descendían los niveles de

testosterona (T). Durante el otoño, sin embargo, las hembras alteraron su respuesta al tratamiento con GnRHa, siendo la dosis de 5 µg GnRHa/kg inefectiva a la hora de inducir la puesta, mientras que la dosis de 1 µg GnRHa/kg produjo varias. De acuerdo con esto, las concentraciones plasmáticas de E<sub>2</sub>, mostraron un pequeño aumento tras la inyección con 1 µg GnRHa/kg. Contrariamente a las hembras, tanto la inyección como el implante de GnRHa en machos no fueron efectivos a la hora de aumentar la espermiación o la producción de espermatozoides, independientemente de la estación en que los tratamientos fueron administrados. Sin embargo, el tratamiento con GnRHa aumentó los niveles plasmáticos de T y 11-ketotestosterona (11-KT) durante la primavera, mientras que en otoño los niveles de andrógenos en plasma disminuyeron tras el tratamiento.

Estos resultados sugieren que la administración de GnRHa durante la primavera, tanto por inyección como por implante, es un tratamiento efectivo para inducir múltiples ovulaciones y puestas en hembras de lenguado senegalés. Sin embargo, estos tratamientos parecen ser ineficaces para estimular la producción de esperma en los machos.

### **Capítulo 5. Estimulación de la espermatogénesis y aumento de la motilidad espermática en machos de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) mediante tratamientos hormonales**

En este estudio se investigó el efecto de la 11-ketoandrostenediona (OA) sobre los niveles plasmáticos de esteroides sexuales y la espermatogénesis en machos de lenguado senegalés implantados con GnRHa. Los machos

fueron tratados con salino (control) o con implantes de GnRH $\alpha$  (50  $\mu$ g/kg) en presencia o ausencia de OA (2 ó 7 mg/kg) durante un periodo de 28 días. El tratamiento sólo con GnRH $\alpha$  estimuló ligeramente la espermatogénesis y la producción de esperma con respecto a los animales control, y esto fue asociado con el aumento de 11-ketotestosterona (11-KT) en plasma el día 7 y de los metabolitos 5 $\beta$ -reducidos de 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihidroxi-4-pregnan-3-ona (17,20 $\beta$ P) hacia el día 28. En cambio, el tratamiento con GnRH $\alpha$ +OA aumentó las concentraciones plasmáticas de 11-KT y de metabolitos 5 $\beta$ -reducidos de 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ P los días 7, 14, y 21. Después del día 28, los testículos de los machos tratados con GnRH $\alpha$ +OA mostraron un número menor de espermatogonias B y espermatocitos I, y un número mayor de espermátidas que los machos tratados sólo con GnRH $\alpha$ . Además, la motilidad de los espermatozoides producidos por los machos tratados con GnRH $\alpha$ +OA aumentó casi el doble que la de los machos tratados sólo con GnRH $\alpha$ , mientras que los niveles plasmáticos de 17,20 $\beta$ P mostraron una disminución respecto a los grupos no tratados con OA, existiendo pues una correlación inversa entre el contenido de 17,20 $\beta$ P libre en testículo y la concentración de metabolitos 5 $\beta$ -reducidos, libres+conjugados, de 17,20 $\beta$ P en plasma.

Estos resultados sugieren que el tratamiento de machos de lenguado senegalés con GnRH $\alpha$ +OA estimula la espermatogénesis, produciéndose espermatozoides con una mayor motilidad. Estos efectos podrían estar mediados por un aumento de 11-KT y/o 17,20 $\beta$ P en la gónada, siendo este último esteroide rápidamente metabolizado a 17,20 $\beta$ P-5 $\beta$ . Futuros estudios son necesarios para identificar los mecanismos endocrinos implicados.



## **CONCLUSIONES**





## CONCLUSIONES

- 7.1. Se ha caracterizado el ADNc codificante del receptor de lipoproteínas de muy baja densidad/vitelogenina (Vtg) en el lenguado senegalés, *vtgr*, y estudiado su modelo temporal y espacial de expresión génica. Nuestros resultados indican que el nivel de transcritos de *vtgr* puede ser utilizado como marcador molecular del número de oocitos reclutados en vitelogénesis.
- 7.2. Se ha caracterizado una nueva proteína de unión a ácidos grasos (FABP) en el lenguado senegalés, a la que hemos denominado FABP11. Filogenéticamente, esta proteína está incluida dentro de una nueva subfamilia relacionada en el grupo FABP3/FABP7, la cual ha sido encontrada exclusivamente en peces teleósteos.
- 7.3. En el ovario, el ARNm de FABP11, *fabp11*, se detecta exclusivamente en las células somáticas de los folículos atrésicos. La acumulación de estos transcritos en el ovario muestra una correlación positiva significativa con el porcentaje de folículos atrésicos, lo que sugiere que *fabp11* puede ser un excelente marcador molecular de atresia ovárica en el lenguado.
- 7.4. Se ha validado un método ELISA competitivo específico para determinar la concentración de Vtg en plasma en el lenguado senegalés. Este método ha demostrado ser válido para detectar variaciones estacionales relativas de Vtg durante el ciclo reproductor en hembras.

- 7.5. El estudio de los niveles circulantes de  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) y Vtg, así como los cambios en el desarrollo ovocitario y en la expresión de *vtgr*, en hembras de lenguado sugieren que la transcripción del gen *vtgr* ocurre predominantemente durante los estadios iniciales de desarrollo ovocitario, justo antes de que el receptor sea necesario para la captación de la Vtg plasmática e iniciar el crecimiento del oocito.
- 7.6. El tratamiento hormonal de hembras F1 de lenguado senegalés con GnRH $\alpha$ , tanto mediante inyecciones sucesivas como mediante implantes de liberación sostenida, es eficaz para inducir la ovulación y la puesta. El tratamiento con GnRH $\alpha$  de machos es aparentemente ineficaz para aumentar la producción de esperma o de espermatozoides, lo que puede causar que los huevos producidos por hembras tratadas con GnRH $\alpha$  no resulten fertilizados.
- 7.7. El tratamiento de machos adultos con GnRH $\alpha$  en combinación con 11-ketoandrostenediona (OA) incrementa los niveles circulantes de 11-ketotestosterona (11-KT), acelerando la espermatogénesis y la producción de espermatozoides con una alta motilidad. Este mecanismo podría estar relacionado con la estimulación de la síntesis de  $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnan-3-ona ( $17,20\beta$ P) en el testículo que sería rápidamente convertida en metabolitos  $5\beta$ -reducidos.
- 7.8. Por tanto, el tratamiento de machos de lenguado senegalés con GnRH $\alpha$ +OA puede ser empleado como potencial terapia hormonal para mejorar disfunciones reproductivas en condiciones de cautividad.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Abascal F, Zardoya R, Posada D, 2005. Selection of best-fit models protein evolution. *Bioinformatics* 21: 2104-2105.
- Adachi S, Ouchi K, Hirose K, Nagahama Y, 1988. Induction of oocyte maturation in vitro by steroid hormones in the red sea bream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 54: 165.
- Amsterdam A, Rotmensch S, 1987. Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocr Rev* 8: 309-337.
- Amsterdam A, Plehn-Dujowich D, Suh BS, 1992. Structure-function relationships during differentiation of normal and oncogen-transformed granulosa cells. *Biol Reprod* 46: 513-522.
- Amsterdam A, Hanoch T, Dantes A, Tajima K, Strauss JF, Seger R, 2002. Mechanisms of gonadotropin desensitization. *Mol Cell Endocrinol* 187: 69-74.
- Anderson MJ, Miller MR, Hinton DE, 1996. In vitro modulation of 17 $\beta$ -estradiol-induced vitellogenin synthesis: Effects of cytochrome P4501A1-inducing compounds on rainbow trout liver cells. *Aqua Toxicol* 34: 1-24.
- André M, Ando S, Ballagny C, Durliat M, Poupard G, Briançon C, Babin PJ, 2000. Intestinal fatty acid binding protein gene expression reveals the cephalocaudal patterning during zebrafish gut morphogenesis. *Int J Dev Biol* 44:249-252.
- Andreu-Vieyra CV, Habibi HR, 2000. Factors controlling ovarian apoptosis. *Can Physiol Pharmacol* 78: 1003-1012.
- Anguis V, Cañavate JP, 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243: 133-145.
- Aragão C, Conceição LEC, Martins D, Rønnestad I, Gomes E, Dinis MT, 2004a. A balanced dietary amino acid profile improves amino acid retention in post-larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 233: 293-304.
- Aragão C, Conceição LEC, Fyhn HJ, Dinis MT, 2004b. Estimated amino acid requirements during early ontogeny in fish with different life styles: gilthead seabream (*Sparus aurata*) and Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 242: 589-605.
- Arias AM, Drake P, 1990. Estados juveniles de la ictiofauna en los caños de las salinas de la Bahía de Cádiz. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Cádiz.
- Avarre JC, Lubzens E, Babin PJ, 2007. Apolipoprotein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipoprotein II/I and vertebrate apolipoprotein B. *BMC Evol Biol* 7:3.
- Babin PJ, 1987. Apolipoproteins and the Association of Egg Yolk Proteins with Plasma High Density Lipoproteins after Ovulation and Follicular Atresia in the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *The J of Biol Chem* 262: 4290-4296.
- Babin PJ, Vernier JM, 1989. Plasma lipoproteins in fish : a review. *J Lipid Res* 1989 30: 467-489.
- Babin PJ, Deryckere F, Gannon F, 1995. Presence of an extended duplication in the low density lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B. Cloning and characterization of the domain in salmon. *Eur J Biochem* 230: 45-51.
- Baynes SM, Scott AP, 1985. Seasonal variations of parameters of milt production and in plasma concentration of sex steroids of male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen Comp Endocrinol* 57: 150-160.
- Baynes SM, Howell BR, Beard TW, 1993. A review of egg production by captive sole, *Solea solea* (L.). *Aquaculture and Fisheries Management* 24: 171-180.
- Baynes SM, Howell BR, Beard TW, Hallam JD, 1994. A description of spawning behaviour of captive dover sole, *Solea solea* (L.). *Neth J Sea Res* 32: 271-275.
- Beams H, Kessel RG, 1973. Oocyte structure and early vitellogenesis in the trout, *Salmo gairdneri*. *Am J Anat* 136: 105-512.
- Bedoui R, 1995. Rearing of *Solea senegalensis* (Kaup, 1958) in Tunisia. *Cahier Options Mediterrane* 16: 31-39.
- Bennett HS, Wyrick AD, Lee SW, McNeil JH, 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives, and simple stains. *Stain Technology* 51: 7194.

- Berlinsky DL, King WV, Smith TIJ, Hamilton RD II, Holloway J Jr, Sullivan CV, 1996. Induced ovulation of Southern flounder *Paralichthys lethostigma* using gonadotropin releasing hormone analogue implants. J World Aquaculture Soc 27: 143-152.
- Berlinsky DL, William K, Hodson RG, Sullivan CV, 1997. Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus*. J World Aquaculture Soc 28: 79-86.
- Besseau L, Faliex E, 1994. Resorption of unemitted gametes in *Lithognathus mormyrus* (Sparidae, Teleostei) : a possible synergic action of somatic and immune cells. Cell Tissue Res 276: 123-132.
- Billard R, Fostier A, Weil C, Breton B, 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. Can J Fish Aquat Sci 39: 65-79.
- Blazer VS, 2002. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. Fish Physiol Biochem 26: 85-101.
- Bogerd J, Babin PJ, Kooiman FP, André M, Ballagny C, Van Marrewijk WJA, Van Der Host D, 2000. Molecular characterization and gene expression in the eye of the apolipoprotein II/I precursor from *Locusta migratoria*. J Comp Neurol 427: 546-558.
- Börchers T, Spenser F, 1994. Fatty acid binding proteins. Curr Top Membranes 40: 226-261.
- Borg B, Antonopoulou E, Anderson E, Carlberg T, Mayer I, 1993. Effectiveness of several androgens in stimulating kidney hypertrophy, a secondary sexual character, in castrated male three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. Can J Zool 71: 2327-2329.
- Borg B, 1994. Androgens in teleosts fishes. Comp Biochem Physiol 109C: 219-245.
- Borja J, 1920. Contribucion al estudio de la fauna ictologica de España. Mem R Acad Cienc Art, Barcelona 16: 1-191.
- Braber L, De Groot SJ, 1973. The food of five flatfish species (Pleuronectiformes) in the southern North Sea. Neth J Sea Res 6: 163-172.
- Bromley PJ, 2003. The use of market sampling to generate maturity ogives and to investigate growth, sexual dimorphism and reproductive strategy in central and south-western North Sea sole (*Solea solea* L.). ICES J Mar Sci 60: 52-65.
- Bujo H, Hermann M, Kaderli MO, Jacobsen L, Sugawara S, Nimpf J, Yamamoto T, Schneider WJ, 1994. Chicken oocyte growth is mediated by an eight ligand binding repeat member of the LDL receptor family. EMBO J 13: 5165-5175.
- Bujo H, Yamamoto T, Hayashi K, Hermann M, Nimpf J, Schneider WJ, 1995a. Mutant oocytic low density lipoprotein receptor gene family member causes atherosclerosis and female sterility. Proc Natl Acad Sci USA 92:9905-9999.
- Bujo H, Lindstedt KA, Hermann M, Mola Dalmau L, Nimpf J, Schneider WJ, 1995b. Chicken oocytes and somatic cells express different splice variants of a multifunctional receptor. The Journal of Biol Chem 270: 23546-23551.
- Cabral H, Costa MJ, 1999. Differential use of nursery areas within the Tagus Estuary by sympatric soles, *Solea solea* and *Solea senegalensis*. Environ Biol Fishes 56: 389-397.
- Cabral HN, 2000. Distribution and abundance patterns of flatfishes in the Sado Estuary, Portugal. Estuaries 23: 351-358.
- Cabrita E, Soares F, Dinis MT, 2006. Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. Aquaculture 261: 967-975.
- Campbell CM, Walsh JM, Idler DR, 1976. Steroids in the plasma of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum). A seasonal study and investigation of steroids involvement in oocyte maturation. Gen Comp Endocrinol 29: 14-20.
- Canario AVM, 1991. Sex steroids in marine flatfish. En "Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, University of East Anglia, Norwich, Norfolk, UK, July 7-12, 1991". Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS (Eds.), FishSymp 91, Sheffield, Reino Unido.
- Canario AVM, Scott AP, 1989a. Synthesis of 20 $\alpha$ -hydroxylated steroids by ovaries of the dab (*Limanda limanda*). Gen Comp Endocrinol 76: 147-158.
- Canario AVM, Scott AP, 1989b. Conjugates of ovarian steroids, including 17 $\alpha$ -20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (maturation-inducing steroid) accumulate in the urine of a marine teleost (plaice; *Pleuronectes platessa*). J Endocrinol 123: R1-R4.

- Canario AVM, Scott AP, 1990a. Effects of steroids and human chorionic gonadotrophin on in vitro oocyte final maturation in two marine flatfish: the dab, *Limanda limanda*, and the plaice *Pleuronectes platessa*. Gen Comp Endocrinol 77: 161-176.
- Canario AVM, Scott AP, 1990b. Plasma levels of ovarian steroids, including 17 $\alpha$ -20 $\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one and 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -pregnane, in female dabs (*Limanda limanda*)—marine flatfish—induced to mature and ovulate with human chorionic gonadotrophin, Gen Comp Endocrinol 77: 177-191.
- Canario AVM, Scott AP, 1990c. Identification of, and development of radioimmunoassays for 17 $\alpha$ ,21-dihydroxy-4-pregnen-3,20-dione and 3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-trihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-one in the ovaries of mature plaice (*Pleuronectes platessa*), Gen Comp Endocrinol 78: 273-285.
- Canario AVM, Scott AP, 1991. Levels of 17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -pregnane, and other sex steroids, in blood plasma of male dab, *Limanda limanda* (marine flatfish) injected with human chorionic gonadotrophin. Gen Comp Endocrinol 83: 258-264.
- Cañavate JP, Fernandez-Diaz C, 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. Aquaculture 174: 255-263.
- Carolsfeld J, Scott AP, Collins PM, Sherwood NM, 1996. Reproductive steroids during maturation in a primitive teleost, the Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). Gen Comp Endocrinol 103: 331-348.
- Cerdà J, Selman K, Hsiao S-M, Wallace RA, 1997. Evidence for the differential regulation of ovarian follicle responsiveness to human chorionic gonadotropin in vitro in a serranid teleost, *Centropristis striata*. Aquaculture 159: 143-157.
- Cerdà J, Reidenbach S, Prätzel S, Franke WW, 1999. Cadherin-catenin complexes during zebrafish oogenesis: heterotypic junctions between oocytes and follicle cells. Biol Reprod 61: 692-704.
- Cerdà J, 2001. Mecanismos Celulares y Moleculares Durante la Maduración Meiótica e Hidratación del oocito de Peces. II Jornadas Teórico-Prácticas de Acuicultura. Patología y Biotecnología de la Reproducción. Universidad Cardenal Herrera-CEU, pp. 129-142.
- Chan SL, Tan CH, Pang MK, Lam TJ, 1991. Vitellogenin purification and development of assay for vitellogenin receptor in oocyte membranes of the Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linnaeus 1766). J Exp Zool 257: 96-109.
- Chaouachi B, Ben Hassine OK, 1998. The status of fish biodiversity in Ichkeul Lagoon, Tunisia. Ital J Zool 65: 303-304.
- Chieffi-Baccari G, Minucci S, Di Matteo L, Chieffi G, 1992. Ultrastructural investigation of the corpora atretica of the electric ray *Torpedo marmorata*. Gen Comp Endocrinol 96: 72-80.
- Chmurzynska A, 2006. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. J Appl Genet 47:39-48.
- Clearwater SJ, Crim LW, 1998. Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. Fish Physiol Biochem 19: 349-357.
- Cobb GW, 1998. Introduction to design and analysis of experiments. Springer-Verlag, New York.
- Copeland PA, Thomas P, 1988. The measurement of plasma vitellogenin in a marine teleost, the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) by homologous immunoassay. Comp Biochem Physiol 91B: 17-23.
- Craik JCA, Harvey SM, 1984. Biochemical changes occurring during final maturation of eggs of some marine and freshwater teleost. J Fish Biol 24: 599-610.
- Craik JCA, Harvey SM, 1986. Phosphorus metabolism and water uptake during final maturation of ovaries of teleost with pelagic and demersal eggs. Mar Biol 90: 285-289.
- Crim LW, Bettles S, 1997. Use of GnRH analogues in fish culture. En: Recent Advances in Marine Biotechnology. Fingerman M, Nagabhushanam R, Thompson MF (Eds). Endocrinology and Reproduction. Oxford & IBH Publishing Co, New Delhi, pp. 369-382.
- Davail B, Pakdel F, Bujo H, Perazzolo LM, Waclawek M, Schneider WJ, Le Menn F, 1998. Evolution of oogenesis: the receptor for vitellogenin from the rainbow trout. J Lipid Res 39, 1929-1937.
- De Groot SJ, 1971. On the interrelationships between morphology of the alimentary tract, food and feeding behaviour in flatfishes. Neth J Sea Res 5: 121-196.
- Deniel C, Le Blanc C, Rodríguez A, 1989. Comparative study of sexual cycles, oogenesis and spawning of two Soleidae, *Solea lascaris* (Risso, 1810) and *Solea impar* (Bennet, 1831), on the western coast of Brittany. J Fish Biol 35: 49-58.



- De Vlaming V, 1983. Oocyte development patterns and hormonal involvements among Teleosts. En: "Control Process in Fish Physiology", Rankin JC, Pitcher TJ, Duggan RTN (Eds), Croom Helm, London, pp. 176-199.
- Dinis MT, 1986. Quatre Soleidae de l'Estuarie du tague. Reproduction et Croissance. Essai d'Élevage de *Solea senegalensis* Kaup 1858. Thèse d'État ès -Sciences Naturelles, Université de Bretagne Occidentale, Brest, Francia.
- Dinis MT, 1992. Aspects of the potential of *Solea senegalensis* Kaup for aquaculture: larval rearing and weaning to artificial diets. *Aquacult Fish Manag* 23: 515-520.
- Dinis MT, Reis J, Arrobas I, 1996. Evaluation of the farming potential for *Solea senegalensis* Kaup, a new species for aquaculture in the Mediterranean area. *Book of Abstracts World Aquaculture 96*, Bangkok, pp. 107-109.
- Dinis MT, Ribeiro L, Soares F, Sarasquete C, 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and Portugal. *Aquaculture* 176 : 27-38.
- Durliat M, André M, Babin PJ, 2000. Conserved protein motifs and structural organization of a fish gene homologous to mammalian apolipoprotein E. *Eur J Biochem* 267: 549-559.
- Eppig JJ, 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829-838.
- Esteves A, Ehrlich R, 2006. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 142: 262-74.
- Fabra M, Raldúa D, Bozzo MG, Deen PMT, Lubzens E, Cerdà J, 2006. Yolk proteolysis and aquaporin-10 play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption. *Dev Biol* (en prensa).
- Fenerich-Verani N, Godinho HM, Narahara MY, 1984. The size composition of eggs of curimatá *Prochilodus scrofa*, induced to spawn with human chorionic gonadotropin (HCG). *Aquaculture* 24: 37-41.
- Fernandez-Trujillo, MA, Porta J, Borrego JJ, Alonso MC, Alvarez MC, Bejar J. Cloning and expression analysis of Mx cDNA from Senegales sole (*Solea senegalensis*). *Fish Shellfish Immunol*. In press.
- Fink G, 1988. Gonadotropin secretion and its control. En: "The Physiology of Reproduction". Knobil E, Neill J (Eds.), Raven, New York, pp. 1349-1377.
- Flos R, Reig L, Fernandez JV, Ambrosio PP, Carbó R, 1995. Ensayos preliminares para el cultivo intensivo de lenguado. En: "Proc V Congr Nal Acuicultura". Castelló F, Calderer A (Eds.), Barcelona, pp. 839-844.
- Flouriot G, Pakdel F, Ducouret B, Valotaire Y, 1995. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *J Mol Endocrinol* 15: 143-151.
- Flower DR, 1996. The lipocalin protein family: structure and evolution. *Biochem J* 318: 1-14.
- Folmar LC, Denslow ND, Rao V, Chow M, Crain DA, Enblom J, Marcino J, Guillette LJ Jr, 1996. vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ Health Perspect* 104: 1096-1101.
- Fukada S, Sakai N, Adachi S, Nagahama Y, 1994. Steroidogenesis in the ovarian follicle of medaka (*Oryzias latipes*, a daily spawner) during oocyte maturation. *Dev Growth Differ* 36: 81-88.
- García-López A, Martínez-Rodríguez G, Sarasquete C, 2005. Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): Anatomy, histology and histochemistry. *Histology and Histopathology* 20: 1179-1189.
- García-López A, Anguis V, Couto E, Canario AVM, Cañavate JP, Sarasquete C, Martínez-Rodríguez G, 2006a. Non-invasive assessment of reproductive status and cycle of sex steroid levels in a captive wild broodstock of Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup). *Aquaculture* 254: 583-593.
- García-López A, Fernández-Pasquier V, Couto E, Canario AVM, Sarasquete C, Martínez-Rodríguez G, 2006b. Testicular development and plasma sex steroid levels in cultured male Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup. *Gen Comp Endocrinol* 147: 343-351.
- García-López A, Pascual E, Sarasquete C, Martínez-Rodríguez G, 2006c. Disruption of gonadal maturation in cultures Senegales sole *Solea senegalensis* Kaup by continuous light and/or constant temperature regimes. *Aquaculture* 261: 789-798.
- García-López A, Couto E, Canario AVM, Sarasquete C, Martínez-Rodríguez G, 2007. Ovarian development and plasma sex steroid levels in cultured female Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146: 342-354.

- Girin M, 1979. Méthodes de production des juveniles chez trois poissons marins, le bar, le turbot et la sole. CNEXO Rapp Sc Tech 39, pp. 202.
- Goos HJ Th, Consten D, 2002. Stress adaptation, cortisol and pubertal development in the male common carp, *Cyprinus carpio*. Mol Cell Endocrinol 197: 105-116.
- Goucha M, Ktari MH, 1981. Présence de *Solea senegalensis* Kaup, 1858 sur les côtes nord de la Tunisie. Rapp Comm int Mer Médit 27: 131-133.
- Grier HJ, 1993. Comparative organization of Sertouli cells including the Sertouli cell barrier. En: "The sertouli cell". Rusell LD; Griswold MD (Eds.), Cache River Press, Clearwater, Florida, pp. 704-739.
- Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O, 2005. PHYML Online-a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. Nucleic Acids Res 33: W557-559.
- Gur G, Melamed P, Levavi-Sivan B, Holland C, Gissis A, Bayer D, Elizur A, Zohar Y, Yaron Z, 1995. Long-term testosterone treatment stimulates GtH II synthesis and release in the pituitary of the black carp, *Mylopharyngodon piceus*. En "Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, The University of Texas at Austin, Austin, Texas, USA, 2-8 July 1995". Goetz FW y Thomas P (Eds.), Fish Symposium 95, Austin, pp 32.
- Guraya SS, 1979. Recent advances in the morphology, cytochemistry and function of Balbiani's vitelline body in animal oocytes. Int Rev Cytol 59: 249-321.
- Guraya SS, 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. En: Monographs of Developmental Biology, Vol 18, Capítulo VIII. Sauer HW (Eds.); Karger, Basel. pp: 169-180.
- Guraya SS, 1994. Gonadal development and production of gametes in fish. Indian Natn Sci Acad 60: 15-32.
- Guzman JM, Marull E, Ramos J, Mylonas CC, Olmos V, Mañanos E, 2005. Inducción hormonal a la puesta del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) mediante la administración de sistemas de GnRHa de liberación sostenida. En: Libro de resúmenes del X Congreso Nacional de Acuicultura, Tomo II, pp. 490-491.
- Habibi H, Lessman CA, 1986. Effect of demeclocine (Colcemid) on goldfish oocyte *in vitro*. Gamete Res 13: 103-114.
- Habibi HR, Andreu-Vieyra C, Mirhadi E, 2001. Functional significance of gonadal gonadotropin-releasing hormone. En: Perspective in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity. Goos HJTh, Rastogi RK, Vaudry H, Pierantoni R (Eds.), Monduzzi Editore. Bolonia, Italia, pp: 959-968.
- Hanhoff T, Lücke C, Spener F, 2002. Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins. Mol Cell Biochem 239:45-54.
- Hara A, Sullivan CV, Dickhoff WW, 1993. Isolation and some characteristics of vitellogenin and its related egg yolk proteins from Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Zool Sci 10 : 245-256.
- Harmin SA, Crim LW, 1992. Gonadotropic hormone-releasing hormone analog (GnRH-A) induced ovulation and spawning in female winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). Aquaculture 104 : 375-390.
- Harmin SA, Crim LW, 1993. Influence of gonadotropic hormone releasing hormone analog (GnRH-A) on plasma sex steroids profiles and milt production in male winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). Fish Physiol Biochem 10: 399-407.
- Harmin SA, Crim LW, 1995. Plasma sex steroids profiles and the seasonal reproductive cycle in male and female winter flounder, *Pleuronectes americanus*. Mar Biol 121: 601-610.
- Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Matthiessen P, Neall P, Sumpter JP, Tylor T, Zaman N, 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. Environ Toxicol Chem 16: 534-542.
- Hart NF, 1990. Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. Int Rev Cytol 121: 1-66.
- Hauerland NH, Spener F, 2004. Fatty acid-binding proteins – insights from genetic manipulations. Prog Lipid Res 43: 328-349.
- Hertzel AV, Bernlohr DA, 2000. The mammalian fatty acid binding protein multigene family: molecular and genetics insights into function. Trends Endocrinol Metab 11: 175-180.
- Hill AA, Brown EL, Whitley MZ, Tucker-Kellog G, Hunter CP, Slonim DK, 2001. Evaluation of normalization procedures for oligonucleotides array data based on spiked cRNA controls. Genome Biology 2:research0055.

- Hiramatsu N, Hara A, Hiramatsu K, Fukada H, Weber GM, Denslow ND, Sullivan CV, 2002a. Vitellogenin-derived yolk proteins of white perch, *Morone americana*: purification, characterization, and vitellogenin-receptor binding. *Biol Reprod* 67: 655-667.
- Hiramatsu N, Ichikawa N, Fukuda H, Fujita T, Sullivan CV, Hara A, 2002b. Identification and characterization of proteases involved in specific proteolysis of vitellogenin and yolk proteins in salmonids. *J Exp Zool* 292: 11-25.
- Hiramatsu N, Chapman RW, Lindzey JK, Haynes MR, Sullivan CV, 2004. Molecular characterization and expression of vitellogenin receptor from White Perch (*Morone americana*). *Biol Reprod* 70: 1720-1730.
- Hirose K, 1976. Endocrine control of ovulation in medaka (*Oryzias latipes*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*). *J Fish Res Board Can* 33: 989-994.
- Holdcraft RW, Braun RE, 2004. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl* 27: 335-342.
- Hornung MW, Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Durhan EJ, Denny JS, Henry TR, Ankley GT, 2004. Mechanistic basis for estrogenic effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to the androgen 17 $\alpha$ -methyltestosterone to 17 $\alpha$ -methyleneestradiol. *Aquat Toxicol* 66: 15-23.
- Howell BR, 1997. A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. *Aquaculture* 155: 355-365.
- Huggart-Nelson DL, Nathwani PS, Kermouni A, Habibi HR, 2002. Molecular characterization of LH- $\beta$  and FSH- $\beta$  subunits and their regulation by estrogen in the goldfish pituitary. *Mol Cell Endocrinol* 188: 171-193.
- Hussein MR, 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update* 11: 162-177.
- Hylland, K., Haux, C. 1997. Effects of environmental oestrogens on marine fish species. *Trends in Analytical Chem.* 16, 606-612.
- Iijima H, Miyazawa M, Sakai J, Magoori K, Ito MR, Suzuki H, Nose M, Kawarabayasi Y, Yamamoto TT, 1998. Expression and characterization of a very low-density lipoprotein receptor variant lacking the O-linked sugar region generated by alternative splicing. *J Biochem* 124: 747-755.
- Imsland AK, Foss A, Conceição LEC, Dinis MT, Delbare D, Schram E, Kamstra A, Rema P, White P, 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Rev Fish Biol Fish* 13: 379-407.
- Inaba K, Buerano, CC, Natividad FF, Morisawa M, 1997. Degradation of vitellogenins by 170 kDa trypsin-like protease in the plasma of the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Comp Biochem Physiol* 118B: 85-90.
- Inbaraj RM, Scott AP, Vermeirssen ELM, 1997. Use of a radioimmunoassay which detects C<sub>21</sub> steroids with a 5 $\beta$ -reduced, 3 $\alpha$ -hydroxylated configuration to identify and measure steroids involved in final oocyte maturation in female plaice (*Pleuronectes platessa*). *Gen Comp Endocrinol* 105: 50-61.
- Ing NH, O'Malley BW, 1995. The steroid hormone receptor superfamily: Molecular mechanisms of action. En "Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical Correlations". Weintraub BD (Ed.), Raven Press, New York, pp. 195-215.
- Iseki I, Amano O, Fujii H, Kanda T, Ono T, 1995. Immunohistochemical localization of two types of fatty acid-binding protein in rat during postnatal development and in immature rat ovaries treated with gonadotropins. *Anat Rec* 241:235-243.
- Iwamatsu T, Katoh T, 1978. Maturation in vitro of oocytes of the loach, *Misgurnus anguillicaudatus* by steroid hormones and gonadotropins. *Ann Zool Japan* 51: 79-89.
- Janz DM, Van Der Kraak G, 1997. Suppression of apoptosis by gonadotropin, 17  $\beta$ -estradiol, and epidermal growth factor in rainbow trout preovulatory ovaries follicles. *Gen Comp Endocrinol* 105: 186-193.
- Janz DM, McMaster ME, Munkittrick KR, Van Der Kraak G, 1997. Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Toxicol Appl Pharmacol* 147: 391-398.
- Jeon H, Blacklow SC, 2005. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem* 74: 535-562.
- Kagawa H, Young G, Nagahama Y, 1983. Relationship between seasonal plasma estradiol-17 $\beta$  and testosterone levels and *in vitro* production by ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biol Reprod* 29: 301-309.

- Kagawa H, Tanaka H, Okuzawa K, Kobayashi M, 1998. GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red sea bream *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol* 112: 80-88.
- Kaipia A, Hsueh AJ, 1997. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 59: 349-363.
- Kamo A, Araki Y, Maeda K, Watanabe H, 2004. Characteristics of invasive cells found in between zona pellucida and oocyte during follicular atresia in mice. *Zygote* 12:269-76.
- Kanamori A, Nagahama Y, 1988. Developmental changes in the properties of the gonadotropin receptors in the ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) to chum salmon gonadotropin during oogenesis. *Gen Comp Endocrinol* 72: 25-38.
- Kanamori A, Adachi S, Nagahama Y, 1988. Developmental changes in the steroidogenic responses of ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) to chum salmon gonadotropin during oogenesis. *Gen Comp Endocrinol* 72: 13-24.
- Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, Nagao T, 2006. "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genomics* 7:64.
- Kanungo J, Patrino TR, Wallace RA, 1990. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. VI. Establishment and verification of conditions for vitellogenin incorporation by oocytes *in vitro*. *J Exp Zool* 254: 313-321.
- Kato Y, Gen K, Maruyama O, Tomizawa K, Kato T, 1993. Molecular cloning of cDNAs encoding two gonadotropin  $\beta$  subunits (GtH-I $\beta$  and -II $\beta$ ) from the masu salmon, *Oncorhynchus masou*: rapid divergence of the GtH-I $\beta$  gene. *J Mol Endocrinol* 11: 275-282.
- Katsiadaki I, Scott AP, Hurst MR, Matthiessen P, Mayer I, 2002. Detection of environmental androgens: a novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environ Toxicol Chem* 21: 1946-1954.
- Kendall AW, Ahlstrom EH, Moser HG, 1984. Early life history stages of fishes and their characters. *Spec. Publ.-Am. Soc Ichthyol Herpetol* 1: 11-22.
- King JA, Millar RP, 1995. Evolutionary aspects of gonadotropin-releasing hormone and its receptor. *Cell Mol Neurobiol* 15: 5-23.
- Kishida M, Specker JL, 1993. Vitellogenin in tilapia (*Oreochromis mossambicus*): induction of two forms by estradiol, quantification in plasma and characterization in oocyte extract. *Fish Physiol Biochem* 12: 171-182.
- Kishida M, Anderson TR, Speaker JL, 1992. Induction by  $\beta$ -estradiol of vitellogenin in striped bass (*Morone saxatilis*): characterization and quantification in plasma and mucus. *Gen Comp Endocrinol* 88: 29-39.
- King W, Thomas P, Sullivan CV, 1994. Hormonal regulation of final maturation of striped bass oocytes *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol* 96: 223-233.
- Kjesbu OS, Kulngsoyr J, Kryvi H, Witthames PR, Walker M, 1991. Fecundity, atresia and egg size of captive atlantic cod (*Gobus morhua*) in relation to proximate body composition. *Can J Fish Aquat Sci* 48: 2333-2343.
- Kling D, 1981. Total atresia of the ovaries of Tilapia leucosticta (*Cichlidae*) after intoxication with the insecticide Lebaycid. *Experientia* 37: 73-74.
- Knoll-Gellida A, Andr e M, Gattegno T, Forgue J, Admon A, Babin PJ, 2006. Molecular phenotype of zebrafish ovarian follicle by serial analysis of gene expression and proteomic profiling and comparison with the transcriptomes of other animals. *BMC Genomics* 7:46.
- Kobayashi W, 1985. Communications of oocyte-granulosa cells in the chum salmon ovary detected by transmission electron microscopy. *Dev Growth Differ* 27: 553-561.
- Koya Y, Watanabe H, Soyano K, Ohta K, Aritaki M, Matsubara T, 2003. Testicular development and serum steroid hormone levels in captive male spotted halibut *Verasper variegatus*, *Fish Sci* 69: 792-798.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- LaFleur GJ Jr, Tomas P, 1991. Evidence for a role of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in the hydration of Atlantic croaker and spotted seatrout oocytes during final maturation. *J Exp Zool* 258: 126-136.
- Lam TJ, 1983. Environmental influences on gonadal activity in fish. En: "Fish Physiology". Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Eds.), Academic Press, London, pp. 65-116.
- Lambert JGD, 1970. The ovary of the guppy, *Poecilia reticulata*. The atretic follicle, a corpus atreticum or a corpus luteum praeovulationis. *Z Zellforsch* 107: 54-67.

- Lang I, 1981. Electron microscopic and histochemical investigations of the atretic oocyte of *Perca fluviatilis* L. (Teleostei). Cell Tissue Res 220: 201-212.
- Larsson DG, Mylonas CC, Zohar Y, Crim LW, 1997. Gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH-A) induces multiple ovulations of high quality eggs in a cold-water, batch-spawning teleost, the yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). Can J Fish Aquat Sci 54: 1957-1964.
- Lee PD, Sladek R, Greenwood CMT, Hudson TJ, 2002. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. Genome Res 12:292-297.
- Lejeune H, Chuzel F, Thomas T, 1996. Paracrine regulation of Leydig cells. Ann Endocrinol 57: 55-63.
- Lench JJ, Lewis SK, Ren L, 1996. In vivo estrogenic activity of nonylphenol in rainbow trout. Fundam Appl Toxicol 30: 229-232.
- Leo CP, Pisarka MD, Hsueh AJ, 2001. DAN array analysis of changes in preovulatory gene expression in the rat ovary. Biol Reprod 65: 269-276.
- Li A, Sadasivam M, Ding JL, 2003. Receptor-ligand interaction between vitellogenin receptor (VtGR) and vitellogenin (Vtg), implications on low-density lipoprotein receptor and apolipoprotein B/E. J Biol Chem 278: 2799-2806.
- Lim HK, Pankhurst NW, Fitzgibbon QP, 2004. Effects of slow release gonadotropin releasing hormone analog on milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder, *Rhombosolea tapirina*. Aquaculture 240: 505-516.
- Lin YA, Rupnow BA, Price DA, Greenburg RM, Wallace RA, 1992. *Fundulus heteroclitus* Gonadotropins III. Cloning and sequencing of gonadotropin hormone (GtH) I and II  $\beta$ -subunits using the polymerase chain reaction. Mol Cell Endocrinol 85: 127-139.
- Liu HW, Stickney RR, Dickhoff WW, 1991. Changes in plasma concentrations of sex steroids in adult Pacific halibut, *Hippoglossus stenolepis*. J World Aquacult Soc. 22: 30-35.
- Liu JX, Gui JF, 2005. Expression pattern and developmental behaviour of cellular nucleic acid-binding protein (CNBP) during folliculogenesis and oogenesis in fish. Gene. 356:181-92.
- Liu RZ, Denovan-Wright EM, Wright JM, 2003. Structure, linkage mapping and expression of the heart-type fatty acid-binding protein gene (*fabp3*) from zebrafish (*Danio rerio*). Eur J Biochem 270 : 3223-3234.
- Liu Z, Kim S, Karsi A, 2001. Channel Catfish Follicle-Stimulating Hormone and Luteinizing Hormone: Complementary DNA cloning and Expression During Ovulation. Mar Biotechnol 3 : 590-599.
- Lo Nostro FL, Grier HJ, Meijide FJ, Guerrero GA, 2003. Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae): the germinal compartment. Tissue Cell 35: 121-132.
- Loir M, Le Gac F, 1994. Insulin-like growth factor-I and -II binding and action on DNA synthesis in rainbow trout spermatogonia and spermatocytes. Biol Reprod 51: 1154-1163.
- Loir M, 1999. Spermatogonia of rainbow trout: II. In vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. Mol Reprod Dev 53: 434-442.
- Lomax DP, Roubal WT, Moore JD, Johnson LL, 1998. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitellogenin in English sole (*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids. Comp Biochem Physiol 121B: 425-435.
- Lowerre-Barbieri SK, Chittenden ME, Barbieri LR, 1996. The multiple spawning pattern of weakfish in the Chesapeake Bay and Middle Atlantic Bight. J Fish Biol 48: 1139-1163.
- Magrané J, Casaroli-Marano RP, Reina M, Gáfvels M, Vilaró S, 1999. The role of O-linked sugars in determining the very low-density lipoprotein receptor stability or release from the cell. FEBS lett 451: 56-62.
- Mañanos E, Zanuy S, Le Menn F, Carrillo M, Nuñez J, 1994. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. I- induction, purification and partial characterization. Comp Biochem Physiol 107B: 205-216.
- Mañanos E, Nuñez J, Zanuy S, Carrillo M, Le Menn F, 1994. Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. II-Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Comp Biochem Physiol 107: 217-223.
- Mandich A, Massari A, Bottero S, Pizzicori P, Goos H, Marino G, 2004. Plasma sex steroid and vitellogenin profiles during gonadal development in wild Mediterranean amberjack (*Seriola dumerilii*). Mar Biol 144: 127-138.
- Martin-Robichaud DJ, Powell J, Wade J, 2000. Gonadotropin-releasing hormone affects sperm production of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Bull Aquacult Assoc Can 4: 45-48.
- Matova N, Cooley L, 2001. Comparative aspects of animal oogenesis. Dev Biol 231: 291-320.

- Matsubara T, Ohkubo N, Andoh T, Sullivan CV, Hara A, 1999. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev Biol* 213: 18-32.
- Mattei X, Siau Y, Thiaw OT, Thiam D, 1993. Peculiarities in the organization of testis of *Ophidion* sp. (Pisces, teleostei). Evidence of two types of spermatogenesis in teleost fish. *J Fish Biol* 43: 931-937.
- Mayer I, Borg B, Schulz R, 1990a. Conversion of 11-ketoandrostenedione to 11-ketotestosterone by blood cells of six fish species. *Gen Comp Endocrinol* 77: 70-74.
- Mayer I, Borg B, Schulz R, 1990b. Seasonal changes in and effect of castration/androgen replacement on the plasma levels of five androgens in the male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Gen Comp Endocrinol* 79: 23-30.
- McDowell EM, Trump BF, 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 100: 405-414.
- Mellanen P, Petanen T, Lehtimäki J, Makela S, Bylund G, Holmbom B, Mannila E, Oikari A, Santti R, 1996. Wood-derived estrogens: Studies in vitro with breast cancer cell lines and in vitro in trout. *Toxicol Appl Pharmacol* 136: 381-388.
- Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, Potter T., 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 20:297-308.
- Methven DA, Crim LW, Norberg B, Brown BA, Goff GP, Huse I, 1992. Seasonal reproduction and plasma levels of sex steroids and vitellogenin in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Can J Fish Aquat Sci* 49: 754-759.
- Millar RP, Troskie B, Sun YM, Ott T, Wakefield I, Myburgh D, Pawson A, Davidson JS, Flanagan C, Katz A, Hapgood J, Illing N, Weinstein H, Sealfon SC, Peter RE, Terasawa E, King JA, 1997. Plasticity in the structural and functional evolution of GnRH : a peptide for all seasons. En: "Proc XIIIth International Congress of Comparative Endocrinology". Kawashima S, Kikuyama S (Eds.), Monduzzi Editore, Italy, pp. 15-27.
- Millar RP, Lowe S, Conklin D, Pawson A, Maudsley S, Troskie B, Ott T, Millar M, Lincoln G, Sellar R, Faurholm B, Scobie G, Kuestner R, Terasawa E, Katz A, 2001. A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc Natl Acad Sci, USA* 98, pp. 9636-9641.
- Mindnich R, Haller F, Halbach F, Moeller G, Hrabé de Angelis M, Adamski J, 2005. Androgen metabolism via 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 in mammalian and non mammalian vertebrates: comparison of the human and the zebrafish enzyme. *J Mol Endocrinol* 35: 305-316.
- Minucci S, DiMatteo L, Pierantoni R, Varriale B, Rastogi RK, Chieffi G, 1986. In vivo and in vitro stimulatory effect of a gonadotropin-releasing hormone analog (HOE 766) on spermatogonial multiplication in the frog, *Rana esculenta*. *Endocrinology* 119: 731-736.
- Miranda ACL, Bazzoli N, Rizzo E, Sato Y, 1999. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. *Tissue Cell* 31: 480-488.
- Miura T, Miura C, 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol Biochem* 28: 181-186.
- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y, 1991a. Human chorionic gonadotropin induces all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Dev Biol* 146: 258-262.
- Miura T, Yamauchi K, Takahashi H, Nagahama Y, 1991b. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc Natl Acad Sci, USA* 88, pp. 5574-5778.
- Miura T, Miura C, Yamauchi K, Nagahama Y, 1995. Human recombinant activin induces proliferation of spermatogonia in vitro in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Sci* 61: 434-437.
- Miura T, Kawamura S, Miura C, Yamauchi K, 1997. Impaired spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*: possibility of the existence of factors that regulate entry of germ cells into meiosis. *Dev Growth Differ* 39: 685-691.
- Miura C, Miura T, Kudo N, Yamashita M, Yamauchi K, 1999. cDNA cloning of a stage specific gene expressed during HCG-induced spermatogenesis in the Japanese eel. *Dev Growth Differ* 41: 463-471.
- Miwa S, Yan L, Swanson P, 1994. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by in vitro ligand autoradiography. *Biol Reprod* 50: 629-642.

- Mommsen PT, Walsh PJ, Vitellogenesis and oocyte assembly, 1988. En: Fish Physiology, Vol 11A. Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Eds.). Academic Press, New York, pp: 347-406.
- Moon SH, Lim HK, Kwon JY, Lee JK, Chang YJ, 2003. Increased plasma 17-hydroxyprogesterone and milt production in response to gonadotropin-releasing hormone agonist in captive male starry flounder, *Platichthys stellatus*. Aquaculture 218 : 703-716.
- Morais S, Koven W, Rønnestad I, Dinis MT, Conceição LEC, 2005. Dietary protein/lipid ratio affects growth and amino acid and fatty acid absorption and metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) larvae. Aquaculture 246: 347-357.
- Morais S, Knoll-Gellida A, André M, Barthe C, Babin PJ. Conserved expression of alternative splicing variants of peroxisomal *acyl-CoA oxidase 1* in vertebrates and developmental and nutritional regulation in fish. Physiol. Genomics. En prensa.
- Mori H, Nakawaga M, Soyano K, Koya Y, 2003. Annual reproductive cycle of black rockfish *Sebastes schlegeli* in captivity. Fish Sci 69: 910-923.
- Morita Y, Perez GI, Maravei DV, Tilly KI, Tilly JL, 1999. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis in vitro. Mol Endocrinol 13: 841-850.
- Mosconi G, Carnevali O, Carletta R, Nabissi M, Polzonetti-Magni AM, 1998. Gilthead seabream (*Sparus aurata*) vitellogenin: purification, partial characterization, and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Gen Comp Endocrinol 110: 252-61.
- Mourot B, Le Bail P-Y, 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenin. J Immunoassay 16: 365-377.
- Mugnier C, Gaignon JL, Fostier A, 1997. In vitro synthesis of 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one by ovaries of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) during oocyte maturation. Gen Comp Endocrinol 107: 63-73.
- Mugnier C, Scott AP, Vermeirssen ELM, Rand-Weaver M, 1999. Two pathways of C<sub>21</sub> steroid biosynthesis in North Sea plaice *Pleuronectes platessa*: what controls them and what is their function? En "Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Bergen, Norway, July 4-9, 1999", Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO (Eds), Bergen 2000, Noruega, pp. 173-175.
- Mugnier C, Guennoc M, Lebegue E, Fostier A, Breton B, 2000. Induction and synchronisation of spawning in cultivated turbot (*Scophthalmus maximus* L.) broodstock by implantation of a sustained-release GnRH-a pellet. Aquaculture 181: 241-255.
- Mylonas CC, Woods III LC, Zohar Y, 1997. Cyto-histological examination of post-vitellogenesis and final oocyte maturation in captive-reared striped bass. J Fish Biol 50: 34-49.
- Mylonas CC, Zohar Y, 2001. Use of GnRH-a-delivery systems for the control of reproduction in fish. Rev Fish Biol Fish 10: 463-491.
- Nader MR, Miura T, Ando N, Miura C, Yamauchi K, 1999. Recombinant human insuline-like growth factor I stimulates all stages of 11-ketosterone-induced spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, in vitro. Biol Reprod 61: 944-947.
- Nagahama Y, 1983. The functional morphology of the teleost gonad. En: Fish Physiology, Vol IX, Capitulo 6. Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Eds.), Reproduction, part A: Endocrine tissues and hormones. Academic Press; pp: 223-275.
- Nagahama Y, Adachi S, 1985. Identification of a maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). Dev Biol 109: 428-435.
- Nagahama Y, 1987a. 17 $\alpha$ -20 $\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one: A teleost maturation-inducing hormone. Dev Growth Differ 29: 1-12.
- Nagahama Y, 1987b. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. Zool Sci 4: 209-222.
- Nagahama Y, Matsuhisa A, Iwamatsu T, Sakai N, Fukada S, 1991. A mechanism for the action of pregnant mare serum gonadotropin on aromatase activity in the ovarian follicle of the medaka, *Oryzias latipes*. J Exp Zool 259: 53-58.
- Nagahama Y, 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. Int J Dev Biol 38: 217-229.
- Nagahama Y, Yoshikuni M, Yamashita M, Tokumoto T, Katsu Y, 1995. Regulation of Oocyte growth and Maturation in Fish. En "Current Topics in Developmental Biology". Pedersen RA, Schatten GP (Eds.), Academic Press Inc, Vol 30, pp. 103-145.

- Nakamura M, Specker JL, Nagahama Y, 1993. Ultrastructural analysis of the developing follicle during early vitellogenesis in tilapia, *Oreochromis niloticus*, with special reference to the steroid producing cells. *Cell Tissue Res* 272: 33-39.
- Naito N, Hyodo S, Okumoto N, Urano A, Nakai Y, 1991. Differential production and regulation of gonadotropins (GtH-I and GtH-II) in the pituitary gland of rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*), during ovarian development. *Cell Tissue Res* 266: 457-467.
- Nimpf J, Schneider WJ, 1998. The VLDL receptor: an LDL receptor relative with eight ligand binding repeats, LR8. *Atherosclerosis* 141:191-202.
- Naito N, Suzuki K, Swanson P, Nozaki M, Kawauchi H, Nakai Y, 1993. Ultrastructural characteristics of two distinct gonadotrophs (GtH-I and GtH-II cells) in the pituitary gland of rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*). *Fish Physiol Biochem* 11: 241-246.
- Norberg B, 1995. Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) vitellogenin: induction, isolation and partial characterization. *Fish Physiol Biochem* 14: 1-13.
- Norberg B, Weltzien F-A, Karlsen Ø, Holm JC, 2001. Effects of photoperiod on sexual maturation and somatic growth in male halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comp. Biochem Physiol* 129B: 357-365.
- Nourani MR, Owada Y, Kitanaka N, Abdelwahab SA, Iwasa H, Sakagami H, Spener F, Kondo H, 2005a. Localization of epidermal-type fatty acid binding protein in macrophages in advanced atretic follicles of adult mice. *J Mol Hist* 36:391-400.
- Nourani MR, Owada Y, Kitanaka N, Sakagami H, Hoshi H, Iwasa H, Spener F, Kondo H, 2005b. Occurrence of immunoreactivity for adipocyte-type fatty acid binding protein in degenerating granulosa cells in atretic antral follicles of mouse ovary. *J Mol Hist* 36:491-497.
- Nozaki M, Naito N, Swanson P, Miyata K, Nakai Y, Oota Y, Suzuki K, Kawauchi H, 1990a. Salmonid pituitary gonadotropins, I: distinct cellular distributions of two gonadotropins, GtH I and II. *Gen Comp Endocrinol* 77: 348-357.
- Nozaki M, Naito N, Swanson P, Dickhoff WW, Nakai Y, Suzuki K, Kawauchi H, 1990b. Salmonid pituitary gonadotropins, II: ontogeny of GtH-I and GtH-II cells in the rainbow trout (*Salmo gairdneri irideus*). *Gen Comp Endocrinol* 77: 358-367.
- Núñez J, Kah O, Geffard M, Le Menn F, 1989. Enzym-linked immunosorbent assay (ELISA) for sole (*Solea vulgaris*) vitellogenin. *Comp Biochem Physiol* 92: 741-746.
- Okabayashi K, Shoji H, Nakamura T, Hashimoto O, Asashima M, Sugino H, 1996. cDNA Cloning and Expression of the *Xenopus laevis* Vitellogenin Receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 224: 406-413.
- Olmedo M, Peleteiro JB, Cal R, Linares F, 2003. Crecimiento de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) en Galicia. *Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura*, Mayo 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, pp. 383- 385.
- Onitake K, Iwamatsu T, 1986. Immunocytochemical demonstration of steroid hormones in the granulosa cells of the medaka, *Oryzias latipes*. *J Exp Zool* 239: 97-103.
- Oppen-Berntsen DO, Olsen SO, Rong CJ, Taranger GL, Swanson P, Walther BT, 1994. Plasma levels of eggshell zr-proteins, estradiol-17 $\beta$ , and gonadotropins during an annual reproductive cycle of atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Exp Zool* 268: 59-70.
- Oshiro T, Hibiya T, 1981. Water absorption of oocytes in the plaice *Limanda yokohamae* during meiotic maturation and its role in rupturing follicles. *Bull Jap Soc Sci Fish* 47: 835-841.
- Padrós F, Zarza C, Estévez A, Crespo S, Furones MD, 2003. La patología como factor limitante para el desarrollo del cultivo del lenguado. *Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura*, Mayo 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, pp. 345-346.
- Palmer EE, Sorensen PW, Adelman IR, 1995. A histological study of seasonal ovarian development in freshwater drum in the Red Lakes, Minnesota. *J Fish Biol* 47: 199-210.
- Pankhurst NW, Poortenaar CW, 2000. Milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder *Rhombosolea tapirina* following treatment with exogenous hormones. *Mar Fresh Behav Physiol* 33: 141-159.
- Pelissero C, Flouriot G, Foucher JL, Bennetau B, Dunogues J, Le Gac F, Sumpter JP, 1993. Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes and in vitro test for the estrogenic potency of chemicals. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44: 263-272.



- Perazzolo LM, Coward K, Davail B, Normand E, Tyler CR, Pakdel F, Schneider WJ, Le Menn F, 1999. Expression and localization of messenger ribonucleic acid for the vitellogenin receptor in ovarian follicles throughout oogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biol Reprod* 60: 1057-1068.
- Pérez L, Aturiano JF, Tomás A, Zegrari S, Barrera R, Espinós FJ, Navarro JC, Jover M, 2000. Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. *J Fish Biol* 57: 1488-1504.
- Perry MM, Gilbert AB, 1979. Yolk transport in the ovarian follicle of the hen (*Gallus domesticus*): lipo-protein-like particles at the periphery of the oocyte in the rapid growth phase. *J Cell Sci* 39:257-272.
- Person-Le Ruyet J, Lahaye J, Deniel C, Metailler R, Devauchelle N, Menu B, Noel T, Baudin-Laurencin F, 1989. El cultivo de peces planos: lenguado y rodaballo. En: "Acuicultura". Barnabé G (Ed.), Ed Omega, pp. 613-653.
- Pescovitz OH, Srivasta CH, Breyer PR, Monts BA, 1994. Paracrine control of spermatogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 5: 126-131.
- Peter RE, Yu KL, 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes : basic and applied aspects. *Rev Fish Biol Fish* 7: 173-197.
- Petersen C, Soder O, 2006. The Sertouli cell – a hormonal target and ‘super’ nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res* 66: 153-161.
- Petrino TR, Greeley MS, Jr, Selman K, Lin YWP, Wallace RA, 1989. Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus*. II. Production of 17 $\alpha$ -hydroxy,20 $\beta$ -dihydroprogesterone, testosterone, and 17 $\beta$ -estradiol by various components of the ovarian follicle. *Gen Comp Endocrinol* 76: 230-240.
- Petrino TR, Lin Y-WP, Netherton JC, Powell DH, Wallace RA, 1993. Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus* V: Purification, characterisation, and metabolism of 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one by intact follicles and its role in oocyte maturation. *Gen Comp Endocrinol* 92: 1-15.
- Pierce JG, Parsons TF, 1981. Glycoprotein hormones : structure and function. *Annu Rev Biochem* 50: 465-495.
- Planas JV, Swanson P, Dickhoff WW, 1993. Regulation of testicular steroid production in vitro by gonadotropins (GTH I and GTH II) and cyclic AMP in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen Comp Endocrinol* 91: 8-24.
- Planas JV, Swanson P, 1995. Maturation-associated changes in the response of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins (GTH I and GTH II) in vitro. *Biol Reprod* 52: 697-704.
- Planas JV, Goetz FW, Swanson P, 1997. Stimulation of brook trout ovarian steroidogenesis by gonadotropins I and II is mediated by the cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate/protein kinase A pathway. *Biol Reprod* 57: 647-654.
- Poortenaar CW, Pankhurst NW, 2000. Testosterone treatment augments LHRH-a induced ovulation in greenback flounder. *Mar Fresh Behav Physiol* 33: 281-291.
- Porta J, 2006. Desarrollo de microsatélites y su aplicación al cultivo del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Tesis doctoral. Universidad de Málaga.
- Poupart G, André M, Durliat M, Ballagny C, Boeuf G, Babin PJ, 2000. Apolipoprotein E gene expression correlates with endogenous lipid nutrition and yolk syncytial layer lipoprotein synthesis during fish development. *Cell Tissue Res* 300: 251-261.
- Prat F, Coward K, Sumpter JP, Tyler CR, 1998. Molecular characterization and expression of two ovarian lipoprotein receptors in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biol Reprod* 58: 1146-1153.
- Prat F, Zanuy S, Carrillo M, 2001. Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH<sub>a</sub>) and pimozide on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 198: 325-338.
- Pudney J, 1995. Spermatogenesis in non mammalian vertebrates. *Microsc Res Tech* 32: 459-497.
- Querat B, 1995. Structural relationships between "fish" and tetrapod gonadotropins. En: "Reproductive Physiology of Fish". Goetz FW, Thomas P (Eds.), Austin, TX: Fish Symposium 95: 7-9.
- Quignard JP, Bourquard C, Shehata S, 1986. Note faunistique concernant les Soleidae du Golfe du Lion. (Pisces, Soleidae). *Vie et Milieu* 36: 141-143.
- Ramos J, 1982. Estudio de la edad y crecimiento del lenguado *Solea solea* (L. 1758) (Pisces soleidae). *Invest Pesq* 46: 275-286.
- Ramos J, 1986a. Luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LH-RH<sub>a</sub>) induces precocious ovulation in common sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture* 54: 185-190.

- Ramos J, 1986b. Induction of spawning in common sole (*Solea solea* L.) with human chorionic gonadotropin (HCG). *Aquaculture* 56: 239-242.
- Richieri GV, Ogata RT, Zimmerman AW, Veerkamp JH, Kleinfeld AM, 2000. Fatty acid binding proteins from different tissues show distinct patterns of fatty acid interactions. *Biochem* 39:7197-7204.
- Rodríguez RB, 1984. Biología y cultivo de *Solea senegalensis* Kaup 1858 en el Golfo de Cádiz. Tesis, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Rodríguez A, Rodríguez RB, 1980. Primera cita en el Mediterraneo de *Solea senegalensis* Kaup, 1858 (Heterosoma, Soleidae). *Invest Pesq* 44: 291-295.
- Rodríguez JL, Souto BF, 2003. Engorde del lenguado Senegalés (*Solea senegalensis* KAUP, 1858) en Galicia con temperatura controlada. *Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura*, Mayo 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, pp. 407- 409.
- Rodríguez L, Begtashi I, Zanuy S, Carrillo M, 2000. Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: Effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at puberty. *Fish Physiol Biochem* 23: 141-150.
- Rodríguez RB, Pascual E, 1982a. Primeros ensayos sobre utilización de la hipófisis del atún (*Thunnus thynnus*) en la maduración y puesta de *Solea senegalensis* y *Sparus aurata*. *Invest Pesq* 97: 1-11.
- Rodríguez RB, Pascual E, 1982b. Effect of dried tuna pituitary on maturation and spawning in *Solea senegalensis* and *Sparus aurata*, and comparison with carp dried pituitary and HCG treatments. *Inf Tecn Inst Invest Pesq Barc* 97, pp. 97.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rosenfeld H, Levavi-Sivan B, Melamed P, Yaron Z, Elizur A, 1997. The GTH  $\beta$  subunits of tilapia: gene cloning and expression. *Fish Physiol Biochem* 17: 85-92.
- Roubal WT, Lomax DP, Willis ML, Johnson LL, 1997. Purification and partial characterization of English Sole (*Pleuronectes vetulus*) vitellogenin. *Comp Biochem Physiol* 118B: 613-622.
- Rueda-Jasso R, Conceição LEC, Dias J, De Coen W, Gomes E, Rees JF, Soares F, Dinis MT, Sorgeloos P, 2004. Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture* 231: 417-433.
- Russel FS, 1976. The eggs and planktonic stages of British marine fishes. *Ac Press Lond* pp. 40.
- Saidapur SK, 1978. Follicular atresia in the ovaries of non mammalian vertebrates. *Int Rev Cytol* 54: 225-244.
- Sargent J, McEvoy L, Estévez A, Bell G, Bell M, Henderson J, Tocher D, 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture* 179: 217-229.
- Schafhauser-Smith D, Benfey TJ, 2002. The purification and development of a quantitative enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the measurement of vitellogenin in diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Fish Physiol Biochem* 24: 287- 298.
- Schlatt S, Meinhardt A, Nieschlag E, 1997. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *Eur J Endocrinol* 137: 107-117.
- Schmitz M, Aroua S, Vidal B, Le Belle N, Elie P, Dufour S, 2005. Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel. *Neuroendocrinology* 81: 107-119.
- Schneider WJ, Nimpf J, Brandes C, Drexler M, 1999. Low-density lipoprotein receptor family: genetics, function, and evolution. *Curr Atheroscler Rep* 1: 115-122.
- Schneider WJ, Nimpf J, 2003. LDL receptor relatives at the crossroad of endocytosis and signaling. *Cell Mol Life Sci* 60: 892-903.
- Schonbaum CP, Perrino JJ, Mahowald AP, 2000. Regulation of the vitellogenin receptor during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Mol Biol Cell*. 11: 511-21.
- Schulz RW, Blüm V, 1991. Extragonadal  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 82: 197-205.
- Scott AP, Canario AV, 1992.  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one 20-sulphate: a major new metabolite of the teleost oocyte maturation-inducing steroid. *Gen Comp Endocrinol* 85: 91-100.
- Scott AP, Sorensen PW, 1994. Time course of release of pheromonally active gonadal steroids and their conjugates by ovulatory goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 96: 309-323.
- Scott AP, Vermeirssen ELM, 1995. Research on reproductive priming pheromones in fish. En "Fish Pheromones: origins and modes of action. Proceedings of a Workshop held at the University of Al-

- garve, Faro, Portugal, 22-24 May 1995”, Canario AVM, Power DM. (Eds). Universidad de Algarve, Portugal, pp. 15-23.
- Scott AP, Hylland K, 2002. Biological effects of contaminants: radioimmunoassay (RIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) techniques for the measurement of marine fish vitellogenins. ICES Techniques in Marine Environmental Sciences no. 31. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark pp: 20.
- Scott, A.P., Bye, V.J., Baynes, S.M., Springate, J.R.C., 1980. Seasonal variations in plasma concentrations of 11-ketosterone and testosterone in male rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J Fish Biol 17, 495-505.
- Scott AP, MacKenzie DS, Stacey NE, 1984. Endocrine changes during natural spawning of the white sucker *Catostomus commersoni*. II. Steroid Hormones. Gen Comp Endocrinol 56: 349-359.
- Scott AP, Sherwood NM, Canario AVM, Warby CM, 1991. Identification of free and conjugated steroids, including cortisol and 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, in the milt of Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*. Can J Zool 69: 104-110.
- Scott AP, Inbaraj RM, Vermeirssen ELM, 1997. Use of a radioimmunoassay which detects C<sub>21</sub> steroids with a 17, 20 $\beta$ -dihydroxyl configuration to identify and measure steroids involved in final oocyte maturation in female plaice (*Pleuronectes platessa*). Gen. Comp Endocrinol 105: 62-70.
- Scott AP, Witthames PR, Vermeirssen ELM, Carolsfeld J, 1999. Prolonged-release gonadotrophin-releasing hormone analogue implants enhance oocyte final maturation and ovulation, and increase plasma concentrations of sulphated C<sub>21</sub> steroids in North Sea plaice. J Fish Biol 55: 316-328.
- Scott AP, Katsiadaki I, Witthames PR, Hylland K, Davies IM, McIntosh AD, Thain J, 2006. Vitellogenin in the blood plasma of male cod (*Gadus morhua*): A sign of oestrogenic endocrine disruption in the open sea? Mar Environ Res. 61: 149-170.
- Sealfon SC, Weinstein H, Millar RP, 1997. Molecular mechanisms of ligand interaction with gonadotropin-releasing hormone receptor. Endocr Rev 18: 180-205.
- Segaloff DL, Ascoli M, 1993. The lutropin/choriogonadotropic receptor...4 years later. Endocr Rev 14: 324-347.
- Sekine S, Saito S, Itoh H, Kawauchi H, Itoh S, 1989. Molecular cloning and sequence analysis of chum salmon gonadotropins cDNAs. Proc Natl Acad Sci USA 86, pp. 8645-8649.
- Selman K, Wallace AR, 1986. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. Am Zool 26: 173-192.
- Selman K, Wallace AR, 1989. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. Zool Sci 6: 211-231.
- Selman K, Wallace RA, Qi X, 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. J Morphol 218: 203-224.
- Sharma MK, Liu R-Z, Thisse C, Thisse B, Denovan-Wright EM, Wright JM, 2006. Hierarchical subfunctionalization of fabp1a, fabp1b and fabp10 tissue-specific expression may account for retention of these duplicated genes in the zebrafish (*Danio rerio*) genome. FEBS J 273:3216-29.
- Shen X, Steyrer E, Retzek H, Sanders EJ, Schneider WJ, 1993. Chicken oocyte growth: receptor-mediated yolk deposition. Cell Tissue Res 272:459-471.
- Shrivastava SS, 1969. Formation of the corpora atretica in *Notopterus notopterus* (Pallas). Acta Zool 50: 77-89.
- Silversand C, Hyllner SJ, Haux C, 1993. Isolation, immunochemical detection, and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts. J Exp Zool. 267: 587-597.
- Slater CH, Schreck CB, Swanson P, 1994. Plasma profiles of sex steroids and gonadotropins in maturing female spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Comp Biochem Physiol 109A: 167-175.
- So YP, Idler DR, Hwang SJ, 1985. Plasma vitellogenin in the landlocked Atlantic salmon, *Salmo salar* Ouananiche: Isolation, homologous radioimmunoassay and immunological cross-reactivity with vitellogenin from other teleosts. Comp Biochem Physiol 81B: 63-71.
- Soares F, Engrola S, Dinis MT, 2001. Anomalías en la pigmentación de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*). Bol Inst Esp Oceanogr 18: 405-408.
- Sol SY, Olson OP, Lomax DP, Johnson LL, 1998. Gonadal development and associated changes in plasma reproductive steroids in English sole, *Pleuronectes vetulus*, from Puget sound, Washington. Fish Bull 96: 859-870.
- Specker JL, Sullivan CV, 1994. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. En: “Perspectives in Comparative Endocrinology”, Davey KG, Tobe SS y Peter RG (Eds.). National Research Council of Canada, Ottawa, pp. 304-315, 416-423.

- Sprengel R, Braum T, Nikolics K, Segaloff DL, Seeburg PH, 1990. The testicular receptor for follicle stimulating hormone: structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol Endocrinol* 4: 525-530.
- Stewart JM, 2000. The cytoplasmic fatty-acid-binding proteins: thirty years and counting. *Cell Mol Life Sci* 57: 1345-1359.
- Stifani S, Le Menn F, Rodriguez JN, Schneider WJ, 1990. Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. *Biochim Biophys Acta*. 1045: 271-279.
- Stocco DM, Clark BJ, 1996. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 17, 221-244.
- Stocco, D.M., 2000. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. *J Endocrinol* 164: 247-253.
- Storch J, Thumser AEA, 2000. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1486:28-44.
- Strauss III JF, Kallen CB, Christenson LK, Watari H, Devoto L, Arakane F, Kiriakidou M, Sugawara T, 1999. The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): a window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking. *Recent Prog Horm Res* 54: 369-394.
- Suzuki K, Tamaoki B-I, Hirose K, 1981. In vitro metabolism of 4-pregnenes in ovaries of a freshwater teleost, the ayu (*Plecoglossus altivelis*): production of  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one and its  $5\beta$ -reduced metabolites, and activation of  $3\beta$ - and  $20\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases by treatment with a fish gonadotropin. *Gen Comp Endocrinol* 45: 473-481.
- Suzuki K, Kawauchi H, Nagahama Y, 1988a. Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen Comp Endocrinol* 71: 292-301.
- Suzuki K, Nagahama Y, Kawauchi H, 1988b. Steroidogenic activities of two distinct gonadotropins. *Gen Comp Endocrinol* 71: 452-458.
- Swanson P, 1991. Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas. En: "Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish University of East Anglia, Norwich, Norfolk, UK, July 7-12, 1991", Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS (Eds.), FishSymp 91, Sheffield, Reino Unido, pp. 2-7.
- Swanson P, Bernard M, Nozaki M, Suzuki K, Kawauchi H, 1989. Gonadotropins I and II in juvenile coho salmon. *Fish Physiol Biochem* 7: 169-176.
- Takahashi H, Takano K, 1971. Sex hormone-induced precocious hypertrophy and ciliation of epithelial cells in the ovarian lumen of the goldfish. *Ann Zool Jpn* 44: 32-41.
- Takahashi S, Kawarabayasi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T, 1992. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:9252-9256.
- Tanaka H, Kagawa H, Hirose K, 1995. Steroidogenic activities of two distinct gonadotropins in red sea bream, *Pagrus major*. En: "Reproductive Physiology of Fish". Goetz FW, Thomas P (Eds.), Austin, TX: Fish Symp 95, pp. 10-12.
- Tao Y, Berlinsky DL, Sullivan CV, 1996. Characterization of a vitellogenin receptor in white perch (*Morone americana*). *Biol Reprod* 55: 646-56.
- Thomas P, 1999. Nuclear and membrane steroid receptors and their functions in teleost gonads. En "Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish". Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, Stefansson SO, (Eds.). Bergen 2000, Bergen, pp. 149- 156.
- Thomas P, Trant JM, 1989. Evidence that  $17\alpha,20\beta$ -21-trihydroxy-4-pregnen-3-one is a maturation-inducing steroid in spotted sea trout. *Fish Physiol Biochem* 7: 185-191.
- Trant JM, Thomas P, 1989. Isolation of a novel maturation-inducing steroid produced in vitro by ovaries of Atlantic croaker. *Gen Comp Endocrinol* 75: 397-404.
- Trant JM, Thomas P, Shackleton CHL, 1986. Identification of  $17\alpha,20\beta$ -21-trihydroxy-4-pregnen-3-one as the major ovarian steroid produced by the teleost *Micropogonias undulatus* during final oocyte maturation. *Steroids* 47: 89-99.
- Truscott B, So YP, Nagler JJ, Idler DR, 1992. Steroids involved with final oocyte maturation in the winter flounder. *J Steroid Biochem Mol Biol* 42: 351-356.
- Tyler CR, 1991. Vitellogenesis in salmonids. En: "Proc IVth Int Symp Reproductive Physiology of Fish". Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS (Eds.), Fish Symp 91, Sheffield, pp. 295-299.

- Tyler CR, Sumpter JP, 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev Fish Biol Fish* 6: 289-318.
- Tyler CR, Sumpter JP, Bromage NR, 1990. An *in vitro* culture system for studying vitellogenin uptake into ovarian follicles of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J Exp Zool*. 255: 216-231.
- Tyler CR, Santos EM, Prat F, 2000. Unscrambling the egg - cellular, biochemical, molecular and endocrine advances in oogenesis. En: "Proceedings of the Sixth International Symposium Of Reproductive Physiology of Fish", Norberg B, Kjesbu OS, Taranger GL, Andersson E, y Stefansson SO (Eds.). Universidad de Bergen.
- Tvedt HB, Benfey TJ, Martin-Robichaud DJ, Power J, 2001. The relationship between sperm density, spermatozoa, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* 194: 191-200.
- Uchida D, Yamashita M, Kitano T, Iguchi T, 2004. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 137: 11-20.
- Ueda H, Young G, Crim LW, Kambegawa A, Nagahama Y, 1983.  $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one: plasma levels during sexual maturation and *in vitro* production by testes of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen Comp Endocrinol* 51: 106-112.
- Ueda H, Kambegawa A, Nagahama Y, 1985. Involvement of gonadotrophin and steroid hormones in spermiation in the amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus*, and goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 59: 24-30.
- Van de Peppel J, Kemmeren P, van Bakel H, Radonjic M, van Leenen D, Holstege FC, 2003. Monitoring global messenger RNA changes in externally controlled microarrays experiments. *EMBO Rep* 4:387-393.
- Van Den Belt, Wester PW, Van Der Ven LTM, Verheyen R, Witters H, 2002. Effects of ethylenestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): Time dependency and reversibility. *Environ Toxicol Chem* 21: 767-775.
- Van Der Kraak G, 1990. The influence of calcium ionophore and activators of protein kinase C on steroid production by preovulatory ovarian follicles of the goldfish. *Biol Reprod* 42: 231-238.
- Van Der Kraak G, 1991. Role of calcium in the control of steroidogenesis in preovulatory ovarian follicles of the goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 81: 268-275.
- Van Der Kraak G, Chang JP, 1990. Arachidonic acid stimulates steroidogenesis in goldfish preovulatory ovarian follicles. *Gen Comp Endocrinol* 77: 221-228.
- Van Der Kraak G, Suzuki K, Peter RE, Itoh H, Kawachi H, 1992. Properties of common carp gonadotropin I and II. *Gen Comp Endocrinol* 85: 217-229.
- Vayda ME, Londraville RL, Cashon RE, Costello L, Sidell BD, 1998. Two distinct types of fatty acid-binding protein are expressed in heart ventricle of Antarctic teleost fishes. *Biochem J* 330: 375-382.
- Vázquez R, González S, Rodríguez A, Mourente G, 1994. Biochemical composition of fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac larvae and first-feeding larvae of Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Aquaculture* 119: 273-286.
- Vázquez R, Álvarez A, Aragón A, García de Lara, M, Mazorra MT, Rendón MC, Gonzalez de Canales ML, 2003. Datos preliminares sobre inducción a puesta del lenguado *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) utilizando condiciones especiales de cautividad. *Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura*, Mayo 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, pp. 391-392.
- Veerkamp JH, Maatman GHJ, 1995. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. *Prog Lipid Res* 34: 17-52.
- Vermeirssen ELM, Scott AP, Mylonas CC, Zohar Y, 1998. Gonadotrophin-releasing hormone agonist stimulates milt fluidity and plasma concentrations of  $17,20\beta$ -dihydroxylated and  $5\beta$ -reduced,  $3\alpha$ -hydroxylated  $C_{21}$  steroids in male plaice (*Pleuronectes platessa*). *Gen Comp Endocrinol* 112: 163-177.
- Vermeirssen ELM, Shields R, Mazorra de Quero C, Scott AP, 2000. Gonadotropin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiol Biochem* 22: 77-87.
- Vermeirssen ELM, Mazorra de Quero C, Shields RJ, Norberg B, Kime DE, Scott AP, 2004. Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotropin-releasing hormone agonist implant. *Aquaculture* 230: 547-567.
- Wahli W, 1988. Evolution and expression of vitellogenin genes. *Trends Genet* 4: 227-232.

- Walzem RL, Davis PA, Hansen RJ, 1994. Overfeeding increases very low density lipoprotein diameter and causes the appearance of a unique lipoprotein particle in association with failed yolk deposition. *J Lipid Res* 35:1354-66.
- Wallace RA, 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates. En: "Developmental Biology". Browder LW (Ed.), Plenum Press, New York, pp. 127-177.
- Wallace RA, Selman K, 1978. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus* I. Preliminary observations on oocyte maturation in vivo and in vitro. *Dev Biol* 62: 354-369.
- Wallace RA, Selman K, 1979. Physiological aspects of oogenesis in two species of stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. and *Apeltes quadracus* (Mitchell). *J Fish Biol* 14: 551-564.
- Wallace RA, Selman K, 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am Zool* 21: 325-343.
- Wallace, R.A., Selman, K., 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J Electron Microscop Tech* 16, 175-201.
- Wallace RA, Boyle SM, Grier HJ, Selman K, Petrino TR, 1993. Preliminary observations on oocyte maturation and others aspects of reproductive biology in captive female snook, *Centropomus undecimalis*. *Aquaculture* 116: 257-273.
- Watanabe T, 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp Biochem Physiol* 73B: 3-15.
- Wallaert C, Babin PJ, 1994. Age-related, sex-related and seasonal changes of plasma lipoprotein concentrations in trout. *J Lipid Res* 35: 1619-1633.
- Wang Y, Ge W, 2003. Spatial expression patterns of activin and its signaling system in the zebrafish ovarian follicle: evidence for paracrine action of activin on the oocytes. *Biol Reprod* 69:1998-2006.
- Watanabe WO, Kuo CM, 1986. Water and ion balance in hydrating oocytes of the grey mullet, *Mugil cephalus* (L.), during hormone-induced final maturation. *J Fish Biol* 28: 425-437.
- Watanabe M, Ono T, Kondo H, 1991. Immunohistochemical studies on the localisation and ontogeny of heart fatty acid binding protein in the rat. *J Anat* 174:81-95.
- Weltzien FA, Taranger GL, Karlsen Ø, Norberg B, 2002. Spermatogenesis and related plasma androgen levels in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comp Biochem Physiol* 132A: 567-575.
- Weltzien FA, Andersson E, Andersen O, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B, 2004. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comp Biochem Physiol* 137: 447-477.
- White RB, Eisen JA, Kasten TL, Fernald RD, 1998. Second gene for gonadotropin-releasing hormone in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, pp. 305-309.
- Whitthames PR, Walker MG, 1995. Determinacy of fecundity and oocyte atresia in sole (*Solea solea*) (Pisces) from the channel, the North Sea and the Irish Sea. *Aquat Living Resour* 8: 91-109.
- Wiegand MD, 1996. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Rev Fish Biol Fish* 6: 259-286.
- Wood AW, Van Der Kraak GJ, 2001. Apoptosis and ovarian function: novel perspectives from the teleosts. *Biol Reprod* 64: 264-271.
- Wood AW, Van Der Kraak G, 2003. Yolk proteolysis in rainbow trout oocytes after serum-free culture: evidence for a model biochemical mechanism of atresia in oviparus vertebrates. *Mol Reprod Dev* 65: 219-227.
- Yamamoto K, Oota I, Takano K, Ishikawa T, 1965. Studies on the maturing process of the rainbow trout, *Salmo gairdneri irideus*. I. Maturation of the ovary of a one-year old fish. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 31: 123-132.
- Yan L, Swanson P, Dickhoff WW, 1992. A two receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). *Biol Reprod* 47: 418-427.
- Yao Z, Crim LW, 1996. A biochemical characterization of vitellogenin isolated from the marine fish ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.), lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp Biochem Physiol* 113B: 247-253.
- Yoshiura Y, Kobayashi M, Kato Y, Aida K, 1997. Molecular cloning of the cDNAs encoding two gonadotropin  $\beta$  subunits (GtH-I  $\beta$  and GtH-II  $\beta$ ) from the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 105: 379-389.
- Yuan JS, Reed A, Chen F, Steward CN Jr, 2006. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7:85.

## *Bibliografía*

---

- Yueh WS, Chang CF, 1997.  $17\alpha,20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one and  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one stimulated spermiation in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. Fish Physiol Biochem 17: 187-193.
- Zarza C, Padrós F, Estévez A, Crespo S, Furones MD, 2003. New fish species for Aquaculture, old pathological problems: the case of Solea sp. Proc 11<sup>th</sup> European Assoc Fish Pathologist, St Julians, Malta.
- Zimmerman AW, Veerkamp JH, 2002. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. Cell Mol Life Sci 59:1096-116.
- Zorrilla I, Arijo S, Chabrillon M, Díaz P, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Moriñigo MA, 2003. *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. J Fish Dis 26: 103-108.

# **ANEXOS**





# High Transcript Level of Fatty Acid-Binding Protein 11 but Not of Very Low-Density Lipoprotein Receptor Is Correlated to Ovarian Follicle Atresia in a Teleost Fish (*Solea senegalensis*)<sup>1</sup>

Maria J. Agulleiro,<sup>3</sup> Michèle André,<sup>4</sup> Sofia Morais,<sup>4</sup> Joan Cerdà,<sup>5</sup> and Patrick J. Babin<sup>2,4</sup>

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries Center of Aquaculture,<sup>3</sup> Sant Carles de la Ràpita, Tarragona 43540, Spain

Génomique et Physiologie des Poissons,<sup>4</sup> Université Bordeaux 1, UMR NuAGe, 33405 Talence, France

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries Lab IRTA-ICM (Consejo Superior de Investigaciones Científicas),<sup>5</sup> 08003 Barcelona, Spain

## ABSTRACT

Transcripts encoding a fatty acid-binding protein (FABP), *Fabp11*, and two isoforms of very low-density lipoprotein receptor (*Vldlr*; vitellogenin receptor) were characterized from the ovary of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Phylogenetic analyses of vertebrate FABPs demonstrated that Senegalese sole *Fabp11*, as zebrafish (*Danio rerio*) homologous sequences, is part of a newly defined teleost fish FABP subfamily that is a sister clade of tetrapod FABP4/FABP5/FABP8/FABP9. RT-PCR revealed high levels of *vldlr* transcript splicing variants in the ovaries and, to a lesser extent, in somatic tissues, whereas *fabp11* was highly expressed in the ovaries, liver, and adipose tissue. In situ hybridization analysis showed *vldlr* and *fabp11* mRNAs in previtellogenic oocytes, whereas no hybridization signals were detected in the larger vitellogenic oocytes. Transcript expression of *fabp11* was strongly upregulated in somatic cells surrounding atretic follicles. Real-time quantitative RT-PCR demonstrated that ovarian transcript levels of *vldlr* and *fabp11* had a significant positive correlation with the percentage of follicles in previtellogenesis and atresia, respectively. These results suggest that the expression level of *vldlr* transcripts may be used as a precocious functional marker to quantify the number of oocytes recruited for vitellogenesis and that *fabp11* mRNA may be a very useful molecular marker for determining cellular events and environmental factors that regulate follicular atresia in fish.

follicular development, gametogenesis, gene regulation, oocyte development, ovary

## INTRODUCTION

Atresia, a follicular degeneration and resorptive process, is a normal physiologic event of vertebrate ovarian morphogenesis. In teleost fish, atresia is involved in normal ovarian growth and

postovulatory regression, mostly in females that are not able to carry out maturation or ovulation after vitellogenesis. The presence of atretic follicles is also frequently associated with environmental stress or changes in hormone levels during vitellogenesis [1–3]. For example, ovarian atresia may be caused by hypophysectomy [1, 4] or exposure to environmental contaminants [5, 6]. It is well established in mammals that ovarian follicular degeneration is a hormonally controlled apoptotic process and is an event of programmed cell death [7–10]. While apoptosis has been demonstrated in the ovary of several fish species [11, 12] and in response to the presence of endocrine-disrupting chemicals [13, 14], a relationship between programmed cell death and atresia has not been firmly established in fish. In addition, induced proteolysis of oocyte yolk proteins may lead to follicular atresia [15]. Hormonal factors produced in fish gonads seem to play a central role in ovarian follicle growth, maintenance of ovarian synchronicity, and the process of ovarian follicular atresia [16, 17].

In teleost fish, as in other oviparous vertebrates, female germinal cells accumulate the informational components and nutritional reserves needed for embryo development [18–21]. Oocyte growth occurs through the uptake of plasma egg yolk precursor proteins, predominantly vitellogenin (Vtg). This glycolipophosphoprotein is synthesized mainly in the liver under estrogenic control; is specifically incorporated in the oocyte by receptor-mediated endocytosis through the very low-density lipoprotein (VLDL) receptor precursor (VLDLR), also named in oviparous animals Vtg receptor (VtGR); and is further cleaved and processed into yolk proteins. The VLDLR gene (*vldlr*) belongs to the supergene family of low-density lipoprotein receptor (LDLR)-related proteins [22]. These plasma membrane receptors have co-evolved in egg laying and viviparous animals to support ligand transport inside the cell and to sustain the reproductive effort of oviparous species [23, 24]. Fatty acid-binding proteins (FABPs) are highly conserved cytoplasmic proteins that bind long-chain fatty acids and other hydrophobic ligands. It is thought that FABPs roles include fatty acid uptake, transport, and metabolism. These may also be responsible in the modulation of cell growth and proliferation [25, 26]. Different FABP types have been immunodetected in rodent ovaries at different physiologic stages [27–30]. It has also been demonstrated that the expression of some genes coding for proteins related to lipid and lipoprotein metabolism, including FABPs and LDLR, are among the most regulated in the rat ovary after human chorionic gonadotropin administration [31]. Previtellogenic fish oocytes express high amounts of *vldlr* and *fabp3* transcripts [32, 33], and the reabsorption of the yolk in atretic follicles produces the appearance of egg yolk proteins

<sup>1</sup>Supported by the French Ministry of Research and Education to P.J.B. and by the Junta Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR, Spain) and Reference Center in Aquaculture (Spain) to J.C. M.J.A. was supported by a predoctoral fellowship from the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Spain). S.M. was supported by a postdoctoral fellowship from the French government.

<sup>2</sup>Correspondence: Patrick J. Babin, Génomique et Physiologie des Poissons, Université Bordeaux 1, UMR NuAGe, Avenue des Facultés, Bât. B2, 33405 Talence Cedex, France. FAX: 33 540008915; e-mail: p.babin@gpp.u-bordeaux1.fr

Received: 16 March 2007.

First decision: 16 April 2007.

Accepted: 25 May 2007.

© 2007 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

ISSN: 0006-3363. <http://www.biolreprod.org>

associated with plasma high-density lipoproteins [34], which enlighten the importance of lipid metabolism and its related genes in follicular growth and degeneration.

Histology of teleost fish gonadal tissue is routinely used to describe and quantify morphologic stages, including the number of vitellogenic and atretic follicles [1, 2, 35], but no molecular markers are currently available to study the mechanisms underlying or regulating the balance between follicular development and atresia in teleosts. Here we describe the molecular characterization from Senegalese sole (*Solea senegalensis*) ovary of cDNAs of VLDLR, including two transcript variants, and of an *Fabp* that was demonstrated to be part of a new type, named *Fabp11*, specific to teleost fishes. The results presented indicate that these transcripts were expressed in previtellogenic oocytes, and *fabp11* transcript expression was strongly upregulated in somatic cells surrounding atretic follicles. Furthermore, we provide evidence that ovarian transcript levels of *vldlr* and *fabp11* had a significant positive correlation with the percentage of follicles in previtellogenesis and atresia, respectively.

## MATERIALS AND METHODS

Procedures relating to the care and use of animals were approved by the Ethics Committee from Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (Spain) in accordance with the Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals.

### Animals

Adult Senegalese soles were raised as previously described [36], and females were killed during three consecutive years at different times of the reproductive cycle, corresponding to different folliculogenesis stages [36, 37]. The body and gonads of each animal were weighed to calculate the gonadosomatic index (GSI: gonad weight/body weight  $\times$  100). A piece of the gonad adjacent to the piece sampled for subsequent RNA extraction was fixed in modified Bouin solution (75% picric acid and 25% formalin) for histologic analysis.

### Histologic Analysis

Ovaries fixed in modified Bouin solution for 3–4 h were dehydrated, embedded in paraplast, sectioned at 5  $\mu$ m, and stained with hematoxylin-eosin. The percentages of previtellogenic, early vitellogenic, vitellogenic, and atretic oocytes were calculated by counting 100–150 total oocytes in at least three different histologic sections from the same ovary, as previously described [36].

### Construction of an Ovarian cDNA Library and Isolation of Senegalese Sole *vldlr* and *fabp11* cDNAs

Total RNAs were extracted from vitellogenic ovaries using the Qiagen RNeasy Maxi Kit (Qiagen, Courtabouef, France), and a cDNA library was constructed in Uni-ZAP XR vector (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) following the manufacturer's instructions. Full-length *vldlr* cDNA was obtained after screening with a <sup>32</sup>P-labeled rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *vldlr* cDNA fragment. The 794-bp probe used was generated after cleavage of trout *vldlr* cDNA (GenBank accession number OMY417877) [38] with *Sma*I and *Xba*I restriction enzymes at 1063 and 1857 bp, respectively.

Three positive clones were identified as *vldlr* cDNA: S9A5, corresponding to the full-length *vldlr* transcript, S5A, a truncated *vldlr* transcript sequence, and S8A2, a chimeric sequence including 5' 579 bp that contained the 402-bp full-length translated region of a cDNA encoding a protein subsequently named *Fabp11* (see below), as well as part of the 5' end of the *vldlr* transcript sequence. The missing 107-bp 3' untranslated region of the *fabp11* transcript was amplified by PCR with the SHF3-S1 sense primer (5'-ACGACAGAA-GACCAAGACCG-3') and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) primer, using the previously described procedure [39] and PCR reaction profile [40].

The VLDLR protein sequence deduced from clone S9A5 lacked the O-linked sugar domain and was, therefore, classified as a VLDLR<sup>-</sup> isoform. The cDNA encoding the VLDLR<sup>+</sup> isoform was amplified with S-og-S1 primer (5'-AGCTCATCCAGCTGTCTAG-3'), located 169 bp upstream, and S-og-AS1 primer (5'-TCCACATGAGGAAACCAC-3'), located 122 bp downstream

from the alternative splicing site of primary transcripts, leading or not to a putative O-linked sugar domain.

### Sequence Data Sets

Deduced protein sequences were extracted from GenBank/EBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) or UniProt (<http://www.ebi.uniprot.org/index.shtml>) databases or, in a few cases, were deduced from Ensembl *Takifugu rubripes* (ETR) ([http://www.ensembl.org/Takifugu\\_rubripes/index.html](http://www.ensembl.org/Takifugu_rubripes/index.html)) or Tetraodon Genome Browser (TGB) (<http://www.genoscope.cns.fr/externe/tetranew/>). Accession numbers (the number in parentheses after the accession number refers to the code number used for sequence designation) for vertebrate FABPs were UniProt:P07148 (1) for FABP1, UniProt:P12104 (2) for FABP2, UniProt:P05413 (3) for FABP3, UniProt:P15090 (4) for FABP4, UniProt:Q01469 (5) for FABP5, UniProt:P51161 (6) for FABP6, UniProt:O15540 (7) for FABP7, and UniProt:P02689 (8) for FABP8 of human (*Homo sapiens*); UniProt:P12710 (9) for FABP1, UniProt:P55050 (10) for FABP2, UniProt:P11404 (11) for FABP3, UniProt:P15090 (12) for FABP4, UniProt:Q05816 (13) for FABP5, UniProt:P51162 (14) for FABP6, UniProt:P51880 (15) for FABP7, UniProt:P24526 (16) for FABP8, and UniProt:O08716 (17) for FABP9 of mouse (*Mus musculus*); UniProt:P02693 (18) for FABP2, UniProt:P07483 (19) for FABP3, UniProt:P70623 (20) for FABP4, UniProt:P55053 (21) for FABP5, UniProt:P80020 (22) for FABP6, UniProt:P55051 (23) for FABP7, and UniProt:P55054 (24) for FABP9 of rat (*Rattus norvegicus*); UniProt:P49924 (25) for FABP1, UniProt:Q45KW7 (26) for FABP2, UniProt:O02772 (27) for FABP3, UniProt:O97788 (28) for FABP4, UniProt:Q2EN74 (29) for FABP5, and UniProt:P10289 (30) for FABP6 of pig (*Sus scrofa*); UniProt:Q90WA9 (31) for FABP1, UniProt:Q7ZZZ5 (32) for FABP2, UniProt:Q6DRR5 (33) for a protein annotated here FABP3, UniProt:Q90X55 (34) for FABP4, UniProt:Q5ZIR7 (35) for a protein annotated here FABP5, UniProt:Q05423 (36) for a protein annotated here FABP7, GenBank:XP\_418309 (37) for FABP8, and UniProt:P80226 (38) for FABP10 of chick (*Gallus gallus*); deduced from clone GenBank:CN098757 (39) for a protein annotated here FABP2, and UniProt:Q28CE2 (40) for FABP7 of Western clawed frog (*Xenopus tropicalis*); UniProt:Q6PGR8 (41) for a protein annotated here FABP3a, UniProt:Q6GPY9 (42) for a protein annotated here FABP3b, UniProt:Q5PPW3 (43) for a protein annotated here FABP7, and UniProt:Q6GPT0 (44), UniProt:Q5FWM7 (45), UniProt:Q66L00 (46), and UniProt:Q6P705 (47) for deduced unclassified FABPs of African clawed frog (*Xenopus laevis*); GenBank:BC095259 (48) for *Fabp1a*, GenBank:XM\_680590 (49) for *Fabp1b*, UniProt:Q9PRH9 (50) for *Fabp2*, UniProt:Q8UVG7 (51) for *Fabp3*, GenBank:NP\_001002076 (52) for *Fabp6*, UniProt:Q9I8N9 (53) for *Fabp7a*, UniProt:Q6U1J7 (54) for *Fabp7b*, UniProt:Q9I8L5 (55) for *Fabp10*, UniProt:Q66180 (56) for a protein annotated here *Fabp11a*, and UniProt:Q503X5 (57) for a protein annotated here *Fabp11b* of zebrafish (*Danio rerio*); UniProt:Q90W92 (58) for *Fabp3*, UniProt:Q645P9 (59) for a protein annotated here *Fabp10*, and deduced from clone GenBank:CN985071 (60) for a protein annotated here *Fabp11* of killifish (*Fundulus heteroclitus*); deduced from clone GenBank:CA845456 (61) for a protein annotated here *Fabp2a*, ETR:NEWSINFRUT00000154534 (62) for a protein annotated here *Fabp2b*, ETR:NEWSINFRUT00000161229 (63) for a protein annotated here *Fabp10*, and deduced from clone GenBank:CA847283 (64) for a protein annotated here *Fabp11* of torafugu (*T. rubripes*); GenBank:AAM22208 (65) for a protein annotated here *Fabp11* of orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*); deduced from clone GenBank:CK890396 (66) for a protein annotated here *Fabp1*, and UniProt:Q6R758 (67) for a protein annotated here *Fabp3* of Atlantic salmon (*Salmo salar*); deduced from clone GenBank:BX866673 (68) for a deduced protein annotated here *Fabp2*, UniProt:O13008 (69) for *Fabp3*, deduced from clone GenBank:CX251727 (70) for a deduced protein annotated here *Fabp10*, deduced from clone GenBank:CA357251 (71) for a deduced protein annotated here *Fabp11a*, and deduced from clone GenBank:CF752694 (72) for a deduced protein annotated here *Fabp11b* of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); UniProt:Q4S6K4 (73) for a protein annotated here *Fabp2*, UniProt:Q4RMMI (74) for a protein annotated here *Fabp7a*, UniProt:Q4T8P8 (75) for a protein annotated here *Fabp7b*, TGB:GSTENT00003005001 (76) for a protein annotated here *Fabp10*, and GenBank:CR733066 (77) for a protein annotated here *Fabp11* of green puffer (*Tetraodon nigroviridis*); deduced from clone GenBank:AM144272 (78) for a protein annotated here *Fabp3*, UniProt:Q2PHF0 (79) for *Fabp7*, deduced from clone GenBank:BJ910672 (80) for a protein annotated here *Fabp10*, and deduced from clone GenBank:BJ875298 (81) for a protein annotated here *Fabp11* of medaka (*Oryzias latipes*); UniProt:O57668 (82) for *Fabp3*, and UniProt:O57691 (H6-FABP; 83) for a protein annotated here *Fabp11* of crocodile icefish (*Cryodraco antarcticus*); UniProt:O57669 (84) for *Fabp3*, and UniProt:O57663 (H6-FABP; 85) for a protein annotated here *Fabp11* of black rockcod (*Notothenia coriiceps*); UniProt:O57670 (86) for *Fabp3*, and UniProt:O57665 (H6-FABP; 87) for a protein annotated here *Fabp11* of

humped rockcod (*Gobionotothen gibberifrons*); UniProt: O57666 (H6-FABP) (88) for a protein annotated here Fabp11 of an Antarctic dragonfish (*Parachaenichthys charcoti*); GenBank: BAA92355 (89) for Fabp3 of Japanese eel (*Anguilla japonica*); deduced from clone GenBank: BM028330 (90) for a protein annotated here Fabp3, deduced from clone GenBank: BE574176 (91) for a protein annotated here Fabp7, and deduced from clone GenBank: BM438483 (92) for a protein annotated here Fabp10 of channel catfish (*Ictalurus punctatus*); deduced from clone GenBank: BJ696441 (93) for a protein annotated here Fabp3 of redbtail sheller (*Ptyochromis* sp.); deduced from clone GenBank: CF661735 (94) for a protein annotated here Fabp11 of carp (*Cyprinus carpio*); GenBank: AM501530 (95) for a protein annotated here Fabp11 of Senegalese sole (*S. senegalensis*). Accession numbers for vertebrate VLDLR/Vtgr sequences used were UniProt: P98155 of human (*Homo sapiens*), UniProt: P98156 of mouse (*Mus musculus*), UniProt: P98165 of chick (*Gallus gallus*), UniProt: Q90W12 and UniProt: O73921 of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), UniProt: Q6NS01 of African clawed frog (*Xenopus laevis*), UniProt: Q7ZTG7 of tilapia (*Oreochromis aureus*), UniProt: Q6Y857 of white perch (*Morone americana*), and UniProt: Q2L4C1 of Senegalese sole (*S. senegalensis*). Accession numbers for Senegalese sole (*S. senegalensis*) *bactin* mRNAs sequences used were GenBank: DQ485686 and GenBank: AM501529.

### Sequence Analyses

Sequences were aligned using EMBOSS needle program and Blosum62 matrix or ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/>). The signal peptide sequence of the deduced protein was predicted using the SignalP 3.0 prediction tool (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) using hidden Markov models trained on eukaryotes. The putative GalNAc *O*-glycosylation sites were predicted using NetOGlyc 3.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>). The phylogenetic tree and branch support values were estimated using three different methodologies of phylogenetic reconstruction: the neighbour joining (NJ), the maximum likelihood (ML), and the Bayesian inference (BI) methods according to the procedures previously described with modifications [41]. NJ algorithm was based on the number of amino acid substitutions per site using the Poisson correction distance method. Bootstrap support values were obtained with 5000 pseudoreplicates. ML analysis was carried out with PHYML v2.4.4 [42] starting from the BIONJ tree, and the gamma distribution for rate heterogeneity across sites ( $\Gamma$ ) was modeled with a four-category  $\Gamma$  distribution and a shape parameter equal to 2. The WAG substitution model was selected by ProtTest v1.3 [43], following the Akaike information criterion, as the best-fitting model among the models tested that could be used in PHYML. Bootstrap values were based on 500 pseudoreplicates to estimate support for the nodes of the ML tree. In the nonparametric bootstrap trees, bootstrap confidence level values of 80 or greater were accepted as significant. BI was performed using MrBayes v3.1.2 [44] with the WAG model of amino acid substitution provided in the package. Two simultaneous runs, each with four simultaneous Markov Chain Monte Carlo (MCMC) chains, were performed for 1 600 000 generations, after which the average standard deviation of split frequencies was 0.009795, saving the current tree to file every 100 generations for a total of 16 001 trees in the initial sample. The first 4000 trees prior to log likelihood stabilization were discarded (as burn-in), and the following 12 001 tree samples were used to estimate topology and tree parameters. A graphic representation of the majority rule consensus tree was generated, and the clades were accepted as significant at  $\geq 0.90$  posterior probability.

### Northern Blot Analysis

Total RNAs were extracted from a previtellogenic (GSI: 1.5%; percentage of previtellogenic oocytes: 99%; percentage of atretic oocytes: 1%) or a vitellogenic (GSI: 11.3%, percentage of vitellogenic oocytes: 10%, percentage of atretic oocytes: 5%) ovary using WIZ RNA isolation reagent without DNase treatment (Ambion, Huntingdon, United Kingdom), according to the manufacturer's instructions. Each RNA sample (10  $\mu$ g) was denatured at 70°C for 15 min in 50% formamide, 10% formaldehyde, 5% borax buffer 10 $\times$ , 50 ng/ $\mu$ l ethidium bromide, and 5% bromophenol blue, separated by electrophoresis on a 1.2% agarose denaturing gel containing 16.8% formaldehyde and 10% borax 10 $\times$  for several hours at 50 V under cold conditions to avoid denaturing the RNAs, and was then transferred to a Hybond-N nylon membrane (GE Healthcare, Orsay, France).

The cDNAs used for probe synthesis were obtained by PCR with the following primers: VTGR-S2 (5'-TGGCWTGGATGCAGAC-3') and VTGR-AS2 (5'-CACATGTAGSNACAGCCTCC-3') for *vldlr*, SHF3-S4 (5'-ATGGTTGAGAGTTTTGTTGGAC-3') and SHF3-AS1 (5'-GTACGTCCTCACTGCGAC-3') for *fabp11*, using S9A5 and S8A2 clones, respectively, as templates. PCR products of 748 bp for *vldlr*, from nucleotides +1415 to +2162 (numbered from the translation initiator codon), and 390 bp for *fabp11*, from

nucleotides -30 to +360, were used as probes after purification, subcloning, and radiolabeling.

### RT-PCR Analysis

For 1  $\mu$ g total RNAs isolated from various tissues with WIZ RNA isolation reagent (Ambion, Huntingdon, United Kingdom) RT-PCR was performed in a final volume of 20  $\mu$ l using the M-MLV Superscript II Reverse Transcriptase RNase H Minus, 500 ng/ $\mu$ l universal Pt RACE primer, and 500 ng/ $\mu$ l hexamer random primers (Promega, Charbonnières les Bains, France) following the manufacturer's instructions. The females used, and thus the percentage of stage-frequency oocytes in histologic sections, are the same as those used for Northern blot analysis. The resulting total cDNAs were used to amplify *vldlr*, *fabp11*, and *bactin* transcript fragments by PCR in a final volume of 25  $\mu$ l. S-og-S1 and S-og-AS1 primers were used for the *vldlr*<sup>+</sup> transcript variant, and SHF3-S4 and SHF3-AS1 were used for *fabp11*. To design specific primers for a *S. senegalensis* *bactin* transcript, a fragment was amplified by standard PCR using ovary cDNAs as a template and degenerated FishBA1 (5'-ACATGGA-GAAGATCTGGC-3') and FishBA2 (5'-GCRTACAGRTCCTTACGGA-3') primers, determined after alignment of teleost fish *bactin* transcripts currently available in GenBank (data not shown). After PCR product purification, subcloning in pGEMT-easy vector, and sequencing, the two specific primers were designed: S-BAC-S (5'-GACCTTCAACTCTCTGC-3') and S-BAC-AS (5'-GTCACACTTCATGATGCTG-3'). RT-PCR was performed under standard conditions, with 34 amplification cycles instead of 30 for *vldlr*. Annealing temperature was 57°C for *bactin*, 59°C for *vldlr*, and 62°C for *fabp11* transcripts.

### In Situ Hybridization Studies

Both antisense and sense digoxigenin-labeled RNA probes were synthesized as previously described [45], with the So-VLDLR and So-FABP11 clones also used for Northern blot analysis. The probes were purified on ProbeQuant G50 microcolumns (GE Healthcare, Orsay, France) and checked for purity by denaturing agarose gel electrophoresis.

The sample treatment and sectioning procedure were as previously described [46], avoiding the acetylating step. The digoxigenin-labeled RNA probe was detected as previously described [47], and the resulting dark blue to purple color indicated localization of the transcripts. The sections were photographed using a digital DMX1200 camera and Eclipse E1000 microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France).

### Real-Time Quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted from ovaries of 16 females sampled at different times of the year, corresponding to various GSIs and percentages of atresia, using Qiagen RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), including a DNaseI treatment step, according to the manufacturer's instructions. RNA was quantified using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Nyxor Biotech, Paris, France), with values of  $A_{260}/A_{280}$  between 2.00 and 2.06, and total RNA integrity was checked by ethidium bromide staining in agarose borax gel. RT reactions were performed with 0.1  $\mu$ g total RNA using the StrataScript qPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene), following the manufacturer's instructions. One RT negative control (without reverse transcriptase) was carried out for each sample.

Real-time quantitative RT-PCR (qPCR) amplifications were performed in triplicate for each sample in a final volume of 20  $\mu$ l with 10  $\mu$ l Brilliant SYBR Green qPCR master mix (Stratagene), 2  $\mu$ l diluted (1:300) cDNA, and 0.5  $\mu$ M (for *vldlr* and *bactin* transcripts) or 0.3  $\mu$ M (*fabp11* transcripts) oligodeoxynucleotide primers. Primers designed to amplify the 161-bp *bactin*, 169-bp *vldlr*, 219-bp *fabp11* transcript sequences were Bact-So-S3 (5'-ACTGCTGCTCCTCCTCCT-3') and Bact-So-AS3 (5'-ATGCTGTTG-TAGGTTGCTCTCGTG-3'), VTGR-So-S1 (5'-CTGTGTTTGAGGACC-GAGTGT-3') and VTGR-So-AS1 (5'-GAGCACCAGTTAGTTCTGACAC-3'), FABP11-So-S4 (5'-ATTTGATCCTGAGCGTGGAC-3') and FABP11-So-AS3 (5'-CGTCTGAGATCTCCCTCTCG-3'), respectively. The *bactin* primer sequences were designed from a published sequence [48]. Sequences were amplified using the MX 3000P qPCR thermal cycler instrument (Stratagene). The two-step qPCR profiles consisted of an initial denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 30 (*bactin*) or 35 (*vldlr* and *fabp11*) cycles, as follows: 30 sec at 95°C, 30 sec at the specific primer pair-annealing  $T_m$  (61°C for *bactin* and *fabp11* and 63°C for *vldlr*), and 30 sec at 72°C. After the amplification phase, 1 min of incubation at 95°C and 30 sec at 55°C, a ramp up to 95°C, at 0.01°C/sec, was performed in which data were collected in continuum to obtain a dissociation curve. The qPCR product sizes were checked on 2% agarose gel, purified, and sequenced. No amplification was observed in RT negative

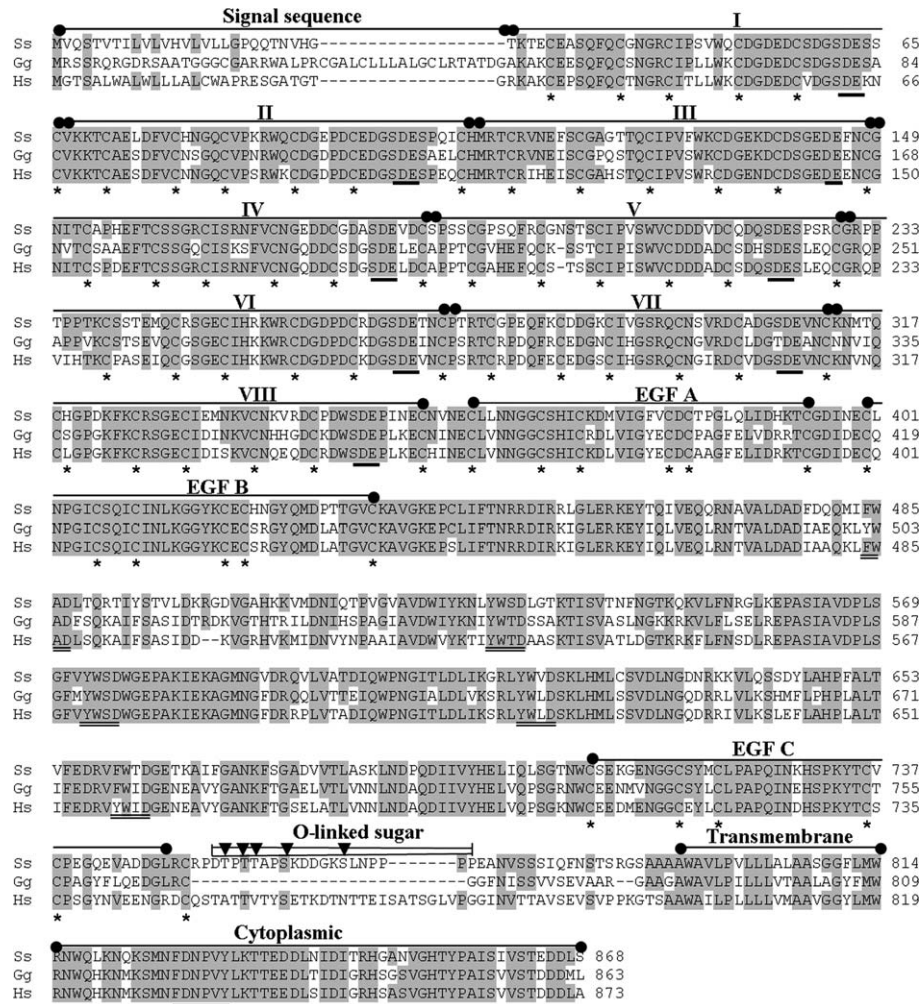


FIG. 1. Alignment of *S. senegalensis* (Ss) VLDLR with homologous protein sequences from *C. gallus* (Gg) and *H. sapiens* (Hs). Amino acid sequences are numbered from the initiator methionine. Residues identical to Senegalese sole sequence are colored gray. Gaps inserted to optimize alignments are indicated by dashes. The receptor is composed of domains that are indicated above the multiple alignment. The eight cysteine-rich repeats, also named LA repeat clusters and numbered I to VIII, make up the ligand-binding domain. Asterisks below the human sequence indicate conserved cysteine residues in LA and A, B, and C EGF-type repeats. The repeats with six cysteines of the ligand-binding domain presumably mediate the folding of the domain into a rigid structure with clusters of negatively charged residues on its surface that contain the signature SDE. These residues are underlined below the human sequence. The YW(T)D sequence found in multiple tandem repeats and predicted to form a beta-propeller structure is double underlined. The facultative O-linked sugar domain found in Senegalese sole VLDLR is double underlined. Black arrowheads above the alignment indicate five potential GalNAc O-glycosylation sites in the sole sequence. The highly conserved FDNVY motif of the cytoplasmic domain, putatively involved in endocytosis of the receptor after ligand binding, is underlined below the human sequence.

controls without enzymes, and no primer-dimer formation occurred in the nontemplate control, containing no cDNA.

In order to assess interrater reproducibility, three independent standard curves were generated, including one in the same run as the templates, using nine serial dilutions (from 4.0 to 0.016 ng) of a pool of first-strand cDNA template from all samples. Standard curves represented the cycle threshold (Ct) value as a function of the logarithm of the number of copies generated, defined arbitrarily as one copy for the most diluted standard. Efficiency of qPCR was always above 97.6%, and the correlation coefficient  $\geq 0.992$  for all target genes. In addition, a data quality control was performed [49] to determine whether differences in target transcript concentrations between samples resulted in different amplification efficiencies, thus biasing relative quantification. Nine samples representative of all stages of gonad development were amplified, in duplicate, at three serial dilutions for each gene (1:31, 1:310, and 1:3100), and the correlation between Ct and the logarithm (base 2)-transformed concentration of the template was examined.

To normalize the qPCR results, genomic DNA and total RNA concentrations were determined from 2  $\mu$ l of the 1:100 dilution of the total tissue homogenate generated by the Qiagen RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Before their extraction, genomic DNA and total RNAs were measured by Quant-iT dsDNA HS and Quant-iT RNA assay kits, respectively, using a Qubit Fluorometer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), following the manufacturer's instructions. Results were normalized by the RNA:DNA ratio and expressed as copy number of transcript per nanogram of genomic DNA. The amount of *bactin* transcript was also used to express the results as the number of copies of each target genes divided by the number of copies of this normalizing gene.

### Statistical Analysis

To analyze the qPCR data quality control results, the correlation model and SAS program (<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2105-7-85-S1.sas> [49]) were used with SAS statistical software (SAS

Institute Inc, Cary, NC). Variations in normalized transcript levels were analyzed for statistical significance by linear regression and correlation using SigmaStat 3.1 software (Systat Software Inc, San Jose, CA). The significance level was set at 0.05.

## RESULTS

### Molecular Characterization of Two Splicing Variants of *vldlr* from *S. senegalensis*

The full-length *Solea vldlr* cDNA sequence, deduced from clone S9A5 and corresponding to VLDLR<sup>-</sup> splicing variant, was deposited in the GenBank/EBI Data Bank under accession number GenBank:AJ879619. The 3968-bp cDNA consisted of a 173-bp 5'-untranslated region, a 2547-bp open reading frame (ORF), and a 1248-bp 3'-untranslated region, including the poly(A) tail at position 3951. The ORF contained a deduced sequence of the deduced protein was 848 amino acids in length. A 27-amino acid signal peptide was predicted, resulting in a mature protein of 821 amino acids with a theoretical molecular mass of 90 595 Daltons. PCR on total cDNAs synthesized from a vitellogenic ovary with primers flanking the putative O-linked sugar domain region amplified a VLDLR<sup>+</sup> transcript variant with an additional 60 bp in the open reading frame, leading to a 4028-bp cDNA. This resulted in a mature protein of 841 amino acids with a theoretical molecular mass of 92 612 Daltons (Fig. 1). Five potential GalNAc O-glycosyl-

Ss	FABP11	M--VESFVGTWKMLQSENFDYMKAI	GVGFATRQVGNRTKPNLILSVDEQGLICMKSQSAFKSTELKF	66
Hs	FABP4	M--CDAFVGTWKLVSSSENFDDYMK	EVGVGFATRQVAGMAKPNMIIISV--NGDVITIKSESTFKNTEISF	65
Hs	FABP5	MATVQQLEGRWRLVDSKGFDEYMK	ELGVGIALRKMAMAKPDCLITC--DGKNLTIKTESTLTKTQFSC	67
Hs	FABP8	M--SNKFLGTWKLVSSSENFDDYMK	ALGVGLATRLKLNLAKEPTVVIISK--KGDIIITIRTESTFKNTEISF	66
Hs	FABP3	M--VDAFLGTWKLVDSKFNDDYMK	SLGVGFATRQVAMTKETTLIEK--NGDILLTKHSTFKNTEISF	66
Hs	FABP7	M--VEAFCATWKLINSNFDEYMKAL	GVGFATRQVGNVTKPTVVIISQ--EGDKVVIKTLSTFKNTEISF	66
		*	* * * * *	* * * * *
Ss	FABP11	QLNEPFDDETTADDRKTKTVVTL	DNGKLVQKQTDWKGKETSIEREISDGKLI	AKCII
Hs	FABP4	ILGQEFDEVTADDRKVKSTITL	DGGVLVHVQKWDGKSTTIKRKREDD	KLVVE
Hs	FABP5	TLGKFEETTADGRKTQTVCN	FDTGALVQHQEWGKSTI	TRKLDGKLVVE
Hs	FABP8	KLGEFEETTADNRKTKSIVTL	QRGSLNQVQRWDGKETT	IKRVLN
Hs	FABP3	KLGEFDETTADDRKVKSI	VTLDGGKLVHLQKWDGQET	TLVRELIDGKLI
Hs	FABP7	QLGEFDETTADDRNCKSV	SLDGDKLVHIQKWDGKET	NFVREIKDGM
		*	* * * * *	* * * * *

FIG. 2. Comparison of amino acid sequences of *Solea senegalensis* (Ss) Fabp11 with selected *H. sapiens* (Hs) FABPs. Amino acid sequences are numbered from the initiator methionine. Residues identical to Senegalese sole sequence are colored gray. Gaps inserted to optimize alignments are indicated by dashes. Sites of identical amino acids in all sequences are indicated by an asterisk below the alignment. The amino acid insertion at position 46 of Senegalese sole Fabp11, which is found in all teleost fish Fabp11 sequences currently available in sequence databases and not identified in FABP3/FABP4/FABP5/FABP7/FABP8/FABP9 and FABP2 clusters of vertebrate species (see Supplemental Figure 1), is indicated by an arrow below the alignment.

ation sites were predicted in the putative *O*-linked sugar domain region.

The VLDLR/VtgR showed a high degree of conservation among different vertebrate species. Comparison of deduced mature sole VLDLR<sup>+</sup> amino acid sequence with human, chicken, and *Xenopus laevis* VLDLR/VtgR mature sequences revealed 69.5%, 69.8%, and 67% identity, respectively, whereas 83.4%–89.8% identity was found between sole VLDLR<sup>-</sup> sequence and homologous sequences from rainbow trout, tilapia, and white perch. Comparison with specific domains revealed a high conservation in the vertebrate lineage of the ligand-binding domain comprising type A ligand-binding repeats, also named LA repeat clusters and containing eight repeats with six cysteines each, which presumably mediate the folding of the domain into a rigid structure with clusters of negatively charged residues, which include the signature tripeptide SDE, on its surface. Also conserved are the EGF precursor domain consisting of type A, B, and C repeats; the LDLR repeat class B containing the YW(T)D repeat found in multiple tandem repeats and predicted to form a beta-propeller structure; a facultative *O*-linked sugar domain, a less conserved transmembrane domain, and a highly conserved cytoplasmic domain including the conserved FDNVPV motif putatively involved in the endocytosis of this receptor after ligand binding (Fig. 1).

#### Molecular Characterization and Phylogenetic Relationships of Fabp11 from *S. senegalensis*

The full-length sole *fabp11* cDNA sequence, deduced from clone S8A2 and extended with 3'-RACE-PCR, was deposited in the GenBank/EBI Data Bank under accession number GenBank:AM501530. The 839-bp cDNA consisted of a 47-bp 5'-untranslated region, a 405-bp open reading frame, and a 370-bp 3'-untranslated region. The predicted sequence of the deduced protein was 134 amino acids with a theoretical molecular mass of 15 044 Daltons (Fig. 2).

Alignment of the amino acid sequence of *Solea* Fabp11 with selected human FABPs (Fig. 2) and vertebrate FABPs previously characterized or extracted from sequence databases (see Supplemental Figure 1, available online at [www.biolreprod.org](http://www.biolreprod.org)), revealed 75.6%–85.1% identity with teleost fish species Fabp11, whereas 63.4% and 82.1% identity was recovered with the duplicated Fabp11 forms found in zebrafish. There was a much lower degree of identity with selected tetrapod FABP4/FABP5/FABP8/FABP9 (e.g., 54.5% and 52.2% with human FABP4 and FABP8, respectively) and

vertebrate FABP3/FABP7 (e.g., 57.4% and 60.4% with human FABP3 and FABP7, respectively), and even less with vertebrate FABP1/FABP6/FABP10 (e.g., 27.1% and 23% with human FABP1 and FABP6, respectively) and FABP2 (e.g., 21.6% with human FABP2) types. The evolutionary relationship of vertebrate genes in the FABP family was evaluated after aligning selected protein sequences of each subfamily, and the phylogenetic analyses were conducted using NJ, ML, and BI (Fig. 3) methods. The phylogenetic tree separated with confidence into separate clusters FABP1/FABP6/FABP10 (group 1), FABP2 (group 2), and FABP3/FABP4/FABP5/FABP7/FABP8/FABP9/FABP11 (group 3) (NJ: 100; ML: 100; BI: 1.00). Significant internal branches of group 3 defined three FABP sequence subgroups. The first one was FABP3 subfamily (NJ: 80; ML: 82; BI: 1.00), and the second one was FABP7 subfamily (NJ: 99; ML: 92; BI: 0.97). The third subgroup formed a monophyletic branch, suggesting that these proteins arose from a common ancestor, and contained FABP4/FABP5/FABP8/FABP9/FABP11 subfamilies. Fabp11 was an additional FABP subfamily that seemed to be specific to teleost fish species (NJ: 97; ML: 97; BI: 1.00). Monophyly of teleost fish Fabp11 was also supported by the presence of an amino acid insertion at position 46 of Senegalese sole Fabp11 that is found in all teleost fish Fabp11 sequences currently available in sequence databases and not identified in the sequence of the other subfamilies of group 3 (i.e., FABP3/FABP4/FABP5/FABP7/FABP8/FABP9). It should be noted that a similar unique amino acid insertion was present in group 1 but not in group 2 sequences. BI method supported with confidence that FABP11 subfamily was a sister clade of tetrapod FABP4/FABP5/FABP8/FABP9 cluster (BI: 0.97). This cluster contained tetrapod sequences only and has been split (BI: 1.00) into two significant internal branches, corresponding to FABP5 subfamily (NJ: 99; ML: 100; BI: 1.00) on one side and FABP4/FABP8/FABP9 (BI: 0.93) on the other side. It should be noted that identified duplicated zebrafish Fabp isoform sequences (i.e., Fabp1, Fabp7, and Fabp11) possibly resulting from the ancestral teleostean fish genomewide duplication were clustered with their respective subfamilies.

#### Expression of *vldlr*, *fabp11*, and *bactin* in Adult *S. senegalensis* Tissues

Northern blot analysis of RNAs extracted from a previtellogenic ovary revealed an intense *vldlr* transcript band of around 4.0 kb, which corresponds to the size of the VLDLR<sup>+</sup> and



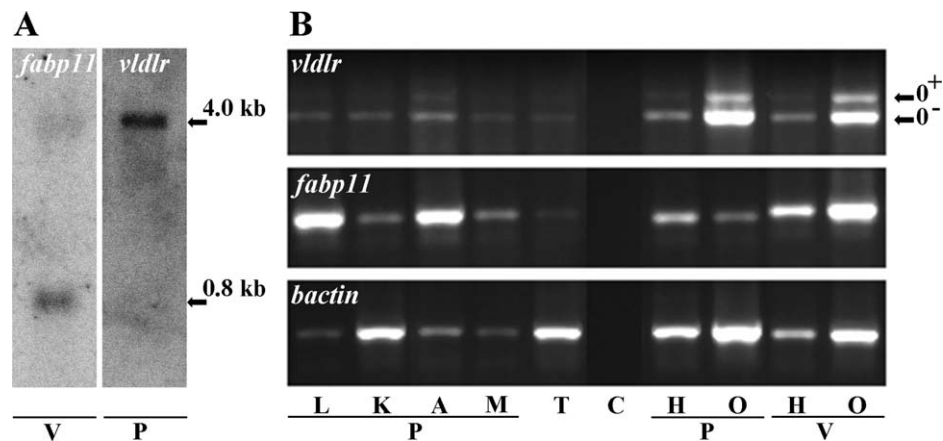
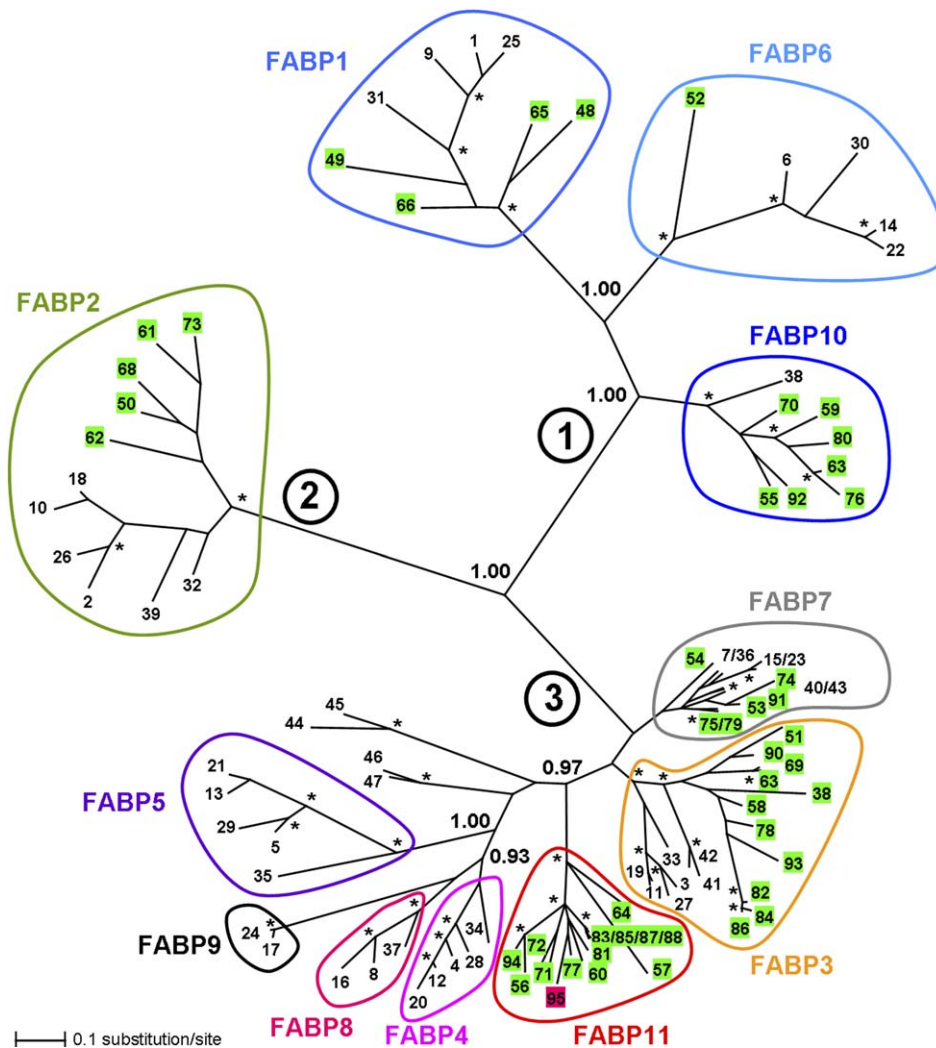
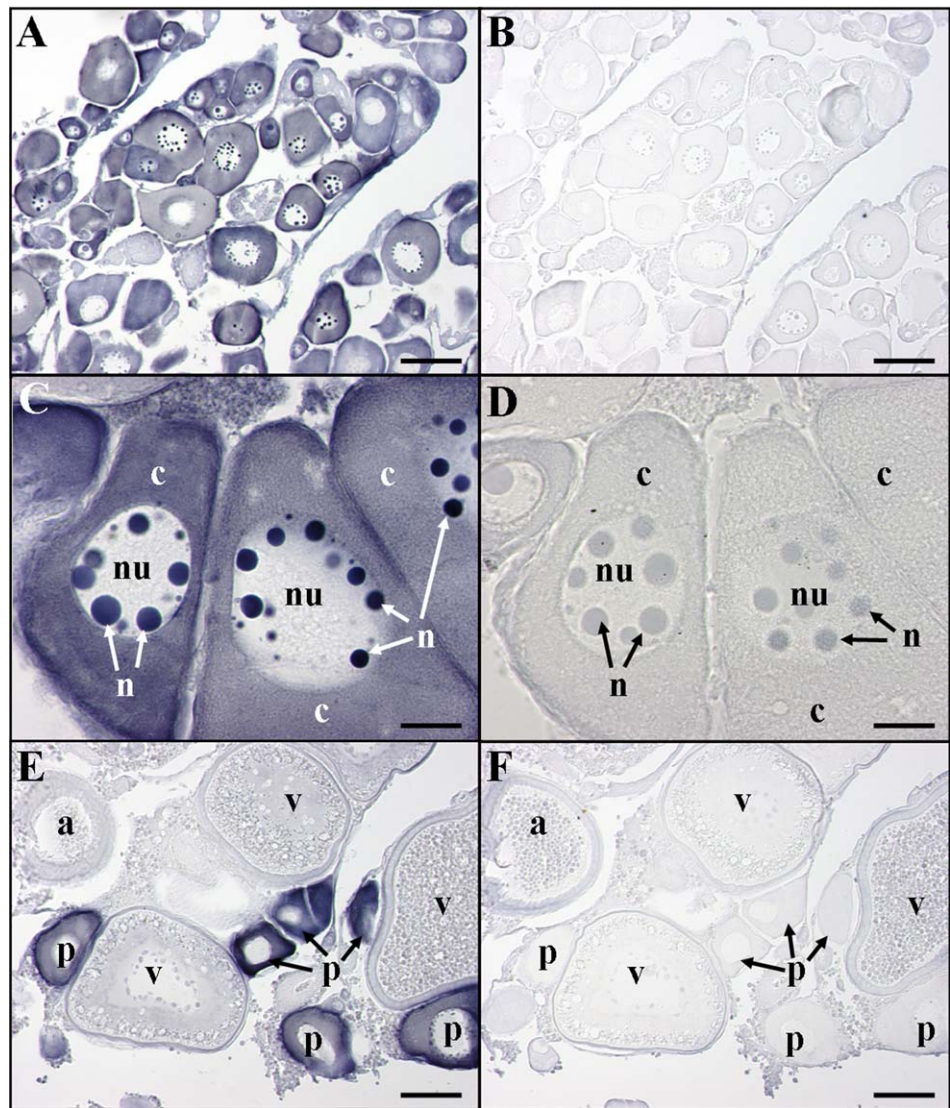


FIG. 4. Expression of *vldlr*, *fabp11*, and *bactin* in adult *S. senegalensis* tissues. **A**) Northern blot hybridization of total RNAs isolated from an ovary of a vitellogenic (V) or a previtellogenic (P) female. Samples (10  $\mu$ g) of purified RNAs were resolved by electrophoresis through agarose formaldehyde gels, and blots were hybridized with  $^{32}$ P-labeled sole *fabp11* or *vldlr* probes. Size of hybridizing species shown is relative to mobility of RNA standards. **B**) Transcripts of *vldlr*, *fabp11*, and *bactin* that were detected by RT-PCR in RNAs extracted from adult tissues. RT-PCR products were generated from total RNAs and were extracted from a previtellogenic (P) or a vitellogenic (V) female and from a male using cDNA-specific primers. The various adult tissues used were: liver (L), kidney (K), adipose tissue (A), muscle (M), testicle (T), heart (H), and ovary (O). A negative control (C) lacking reverse transcriptase generated no RT-PCR products. The two alternative splicing variants of primary transcripts leading to a putative (O+) or not putative (O-) O-linked sugar domain are indicated on the right.

FIG. 5. Cellular localization of *vldlr* transcripts in *Solea senegalensis* ovaries. In situ hybridization on ovarian histologic sections, of a previtellogenic (A–D; GSI: 1.5%; percentage of previtellogenic oocytes: 99%; percentage of atretic oocytes: 1%) or a vitellogenic (E and F; GSI: 11.3%; percentage of vitellogenic oocytes: 10%; percentage of atretic oocytes: 5%) female. The sections were hybridized with antisense (A, C, E) or sense (B, D, F) digoxigenin-labeled riboprobes recognizing both splicing variants. The hybridization signal is colored dark-blue to purple. No staining signal was observed using the sense probe. Transcripts are localized in high concentrations in the cytoplasm (c) and nucleoli (n) of previtellogenic oocytes (p). a, atretic oocyte; nu, nucleus; v, vitellogenic oocyte. Bar = 100  $\mu$ m (A, B, E, F) and 16  $\mu$ m (C and D).



VLDLR<sup>-</sup> transcript variants (Fig. 4A). The same methodology applied to RNAs extracted from a vitellogenic ovary revealed a *fabp11* transcript band of around 0.8 kb, corresponding to the size of the recovered transcript.

RT-PCR using specific *vldlr* primers flanking the deduced *O*-linked sugar domain detected both mRNA transcript variants in ovaries in both previtellogenic and vitellogenic stages (Fig. 4B). However, there was a higher proportion of the smaller, 291-bp, amplified band, corresponding to the VLDLR<sup>-</sup> isoform, than of the 351-bp amplified band, corresponding to the additional 60-bp *O*-linked sugar domain of the VLDLR<sup>+</sup> isoform (Fig. 4B). These two variants were also detected to a lesser extent in heart and adipose tissue, whereas the short transcript variant was also found in trace amount in liver, kidneys, muscles, and testicles. Tissue expression of *fabp11* and *bactin* transcripts was also investigated by RT-PCR and showed that the specific products were amplified from the total RNAs of all tissues examined (Fig. 4B). Transcript levels of *fabp11* were remarkably high in liver, adipose tissue, and vitellogenic ovaries, whereas a small amount was amplified from previtellogenic ovaries, heart, kidneys, and muscles, and trace amount was found in testicles. In the conditions used, *bactin* transcript was highly

amplified from ovaries, kidneys, testicles, and heart, and to a lesser extent from liver, adipose tissue, and muscles.

#### *Cellular Localization of vldlr and fabp11 Transcripts in S. senegalensis Ovaries*

Ovarian development in Senegalese sole was group synchronous, with two groups of oocytes being observed: one developing and the second in a previtellogenic, resting stage. In situ hybridization studies were conducted on serial sections at different ovarian developmental stages, using an antisense probe able to detect both VLDLR<sup>+</sup> and VLDLR<sup>-</sup> splicing variants. A strong *vldlr* hybridization signal was localized in the cytoplasm and nucleoli of previtellogenic oocytes (Fig. 5, A, C, and E), whereas hybridization with a sense probe resulted in no signal (Fig. 5, B, D, and F). The staining signal was also absent in vitellogenic oocytes, as well as in the surrounding granulosa and theca layers (Fig. 5E).

The distribution of *fabp11* mRNA in the ovaries revealed a hybridization signal in the cytoplasm of previtellogenic oocytes (Fig. 6, A, C, and E). A very strong signal was also observed in somatic cells of atretic follicles in both the previtellogenic (Fig. 6A) and vitellogenic (Fig. 6, C, E, G, and I) ovarian stages. Atretic follicles were characterized by the disintegration



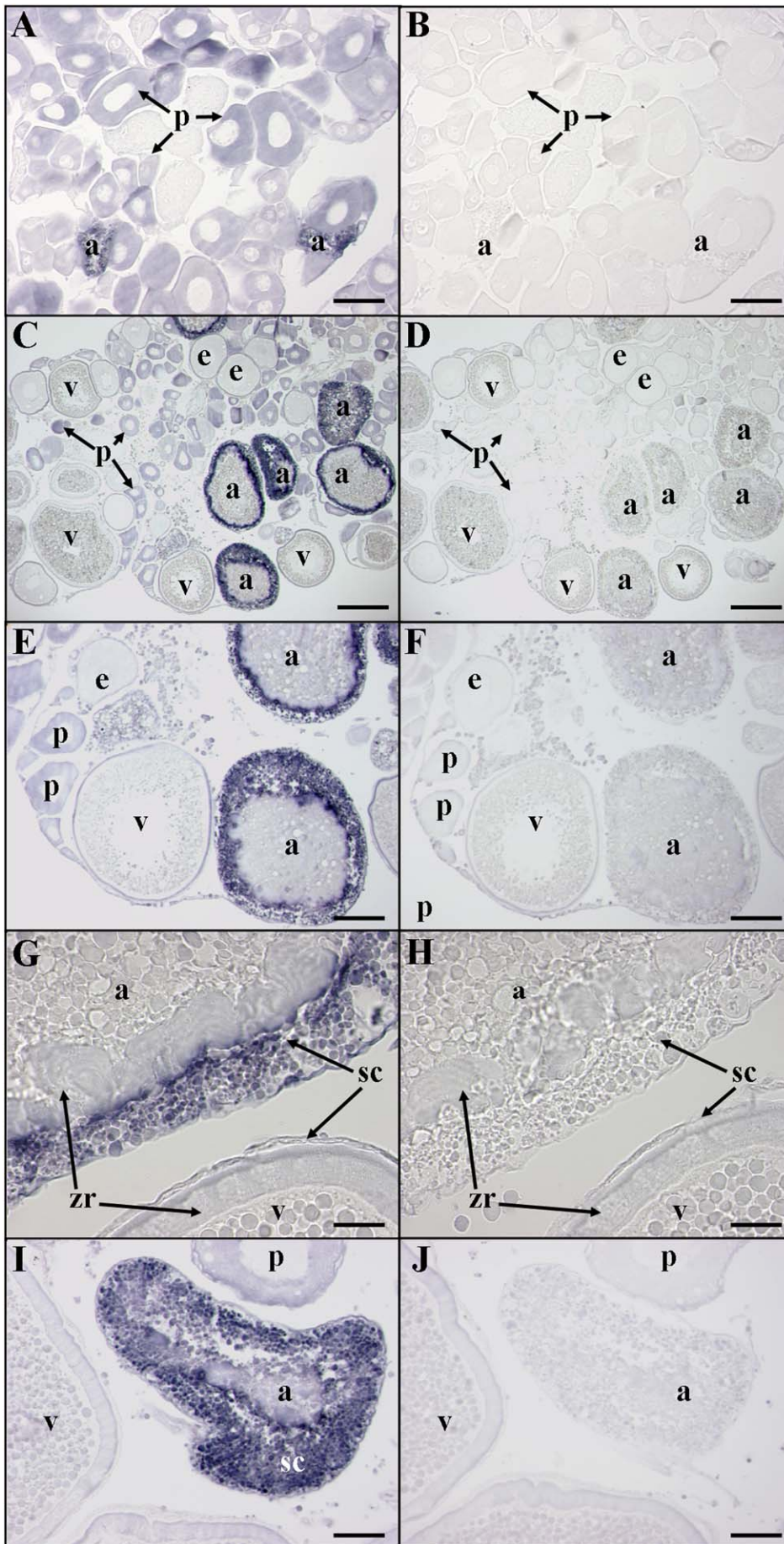


FIG. 6. Cellular localization of *fabp11* transcripts in *S. senegalensis* ovaries. In situ hybridization on ovarian histologic sections from a previtellogenic (A and B; the same animal as used in Fig. 5) or a vitellogenic (C–J; GSI: 4%; percentage of vitellogenic oocytes: 6%; percentage of atretic oocytes: 5%) female. The sections were hybridized with antisense (A, C, E, G, I) or sense (B, D, F, H, J) digoxigenin-labeled riboprobes. No staining signal was observed using the sense probe. A moderate hybridization signal is localized in the cytoplasm (c) of previtellogenic oocytes (p). High *fabp11* transcript levels are detected in the somatic cells (sc) surrounding atretic oocytes (a). e, early vitellogenic oocyte; nu, nucleus; v, vitellogenic oocyte; zr, zona radiata. Bar = 250  $\mu$ m (C, D), 100  $\mu$ m (A, B, E, F), 50  $\mu$ m (I, J), and 25  $\mu$ m (G, H).

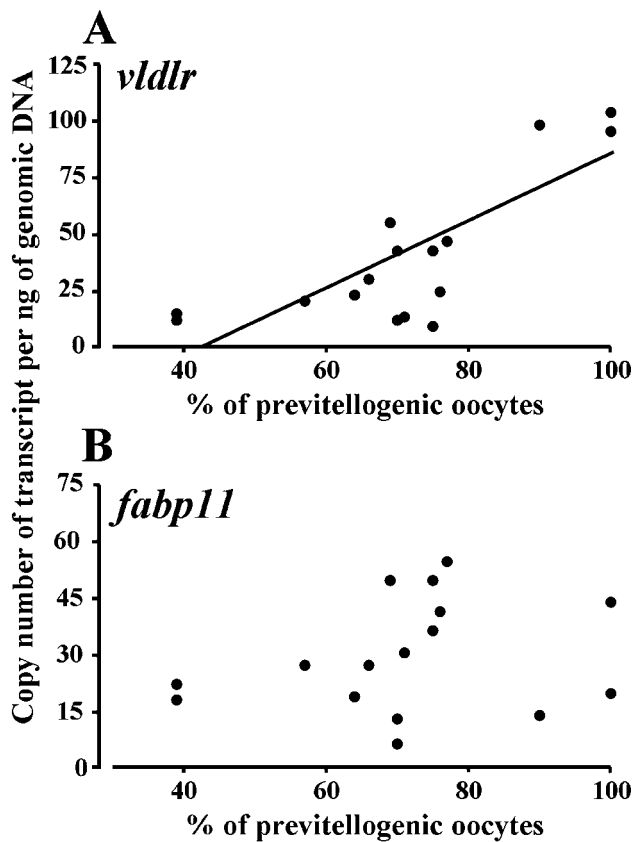


FIG. 7. Relationship between the copy number of *vldlr* (A) or *fabp11* (B) transcripts and the percentage of previtellogenic oocytes in *S. senegalensis* ovary. The percentage of oocytes in previtellogenesis was counted on histologic sections, and the amount of *vldlr* or *fabp11* transcripts was quantified by real-time quantitative RT-PCR from 16 females. Transcript levels were normalized by the RNA:DNA ratio in the sample, and the number of copies of selected transcripts was expressed as copy number of transcript per nanogram of genomic DNA. The linear regression in A was:  $y = 1.47x - 67.54$ ;  $r^2 = 0.586$ ; slope was significantly different from zero at  $P = 0.0005$ ; and correlation between the two variables was significant, with nonparametric Spearman  $r = 0.521$ ,  $P$  (two-tailed) = 0.039.

of the nucleus (Fig. 6E), zona radiata breakdown (Fig. 6G), and modification of the appearance of yolk globules (Fig. 6, E and G), as well as by an increase in the number and size of extra-oocyte follicular cells (Fig. 6, G and I), resulting in residual atretic follicles that strongly expressed *fabp11* transcripts (Fig. 6, A and I). No staining signal was detected in vitellogenic oocytes (Fig. 6, C, E, G, and I) or in parallel sections treated with the sense probe (Fig. 6, B, D, F, H, and J).

#### Differential Expression of *vldlr*, *bactin*, and *fabp11* During Oogenesis as Evaluated by qPCR

The correlation model used for qPCR data quality control of nine representative samples revealed: first, a simple linear relationship for each gene and sample combination, with slopes not significantly different from  $-1$ ; and second, very similar slopes for all three combinations of genes and samples that were not significantly different from each other (data not shown). This test confirmed the acceptability of the qPCR data and the absence of a sample dilution effect [49].

The expression level of *bactin*, *vldlr*, and *fabp11* transcripts was determined by qPCR analysis of ovarian samples obtained from 16 females at different stages of gonad development. The level of *bactin* transcripts was initially determined with the

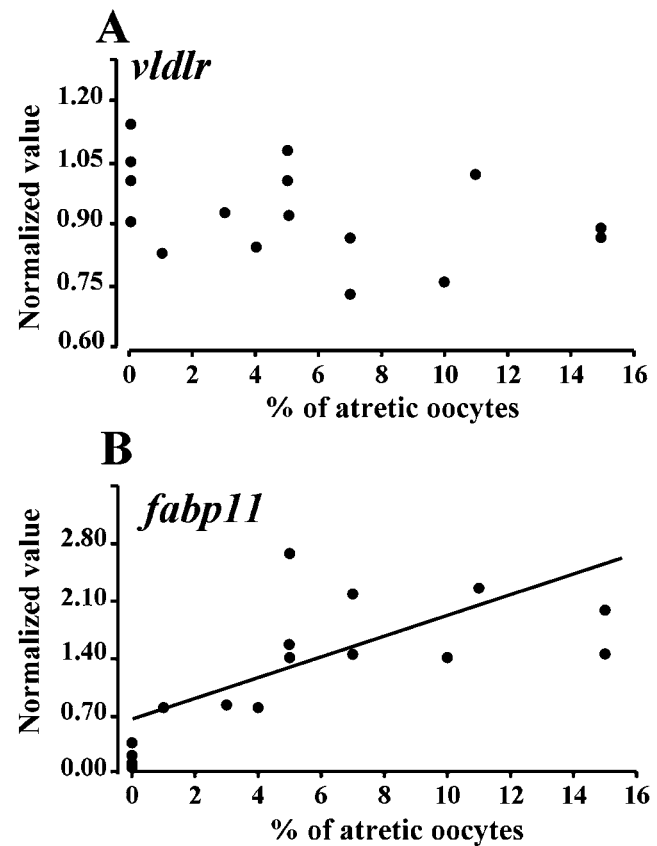


FIG. 8. Relationship between the expression level of *vldlr* (A) or *fabp11* (B) transcripts and the percentage of atretic oocytes in *S. senegalensis* ovary. The percentage of oocytes in atresia was counted on histologic sections, and the amount of *vldlr* or *fabp11* transcripts was quantified by qPCR from 16 females. Transcript level of *bactin* was also quantified to use as a normalizing gene, and the results shown are the number of copies of *vldlr* or *fabp11* transcripts divided by the number of copies of *bactin* transcripts. The linear regression in B was:  $y = 0.08x + 0.63$ ;  $r^2 = 0.334$ ; slope was significantly different from zero at  $P = 0.019$ ; and correlation between the two variables was significant, with nonparametric Spearman  $r = 0.755$ ,  $P$  (two-tailed) = 0.0007.

intention of using it as a reference normalizing gene. However, it was later found that the quantity of transcripts fluctuated, depending on the oogenesis stage frequency profile. Expression of *bactin* had a significant positive correlation with the percentage of previtellogenic oocytes (data not shown) and a negative correlation with the percentage of vitellogenic oocytes (data not shown), thus hampering its use as a reference gene under these conditions. Other authors had already noticed that housekeeping genes are not always good as normalizing genes [50], and proposed other methods for normalizing qPCR or microarray data [51–53]. Consequently, in these experimental conditions, qPCR data (i.e., Ct converted into copy number through a dilution series standard curve) were normalized by the genomic RNA:DNA ratio. As assessed by visual counts on adjacent histologic ovarian sections, our results demonstrated a significant positive correlation between *vldlr* transcript levels and the percentage of previtellogenic oocytes (Fig. 7A), and a negative correlation with the percentage of vitellogenic oocytes (data not shown). In contrast, *fabp11* transcript levels were not significantly affected by the percentage of previtellogenic (Fig. 7B) and vitellogenic (data not shown) oocytes in the samples.

Probably due to the high amount of somatic cells around the atretic oocyte (Fig. 6, E, G, and I), normalization by the

genomic RNA:DNA ratio did not give any strong correlation between *vldlr* or *fabp11* transcript levels and the percentage of atretic follicles in histologic samples. However, *bactin* could be used as a reference gene for atresia, as no correlation was observed between *bactin* transcript levels and the percentage of atretic follicles in the ovary (data not shown). No change in *vldlr* expression was detected in relation to the percentage of atretic follicles (Fig. 8A). In contrast, *fabp11* transcript levels were correlated significantly with the percentage of atretic follicles in ovarian histologic sections (Fig. 8B). It should be noted that in farmed Senegalese sole, atresia occurred at all stages of follicle development, but its prevalence was significantly correlated with the number of vitellogenic oocytes (data not shown).

## DISCUSSION

Oocyte growth, particularly in oviparous species, is characterized by the intense deposition of products (e.g., RNAs, proteins, lipids, vitamins, and hormones) that enable the subsequent development into a viable embryo. The avian VLDLR, also termed LDLR relative with 8 binding repeats (LR8) or VtgR, is a receptor of VLDL and of Vtg, as documented by both biochemical and genetic evidence in chicken [54, 55]. These lipoproteins are selectively sequestered by growing oocytes due to receptor-mediated endocytosis [55, 56]. The overall modular structure of mammalian VLDLR is virtually superimposable with that of human LDLR, except that its ligand-binding domain contains eight LA repeats rather than seven [57]. The vertebrate VLDLR exists in variant forms arising from differential splicing. The longer and predominant splice form in mammalian tissues contains an additional exon specifying an *O*-linked sugar domain similar to that always present in LDLRs (28–30 amino acids long). Chicken oocytes, on the other hand, express a shorter variant, named LR8<sup>-</sup>, coding a receptor without the *O*-linked sugars, whereas the somatic cells and tissues, particularly the granulosa cells surrounding the oocytes, express predominantly LR8<sup>+</sup> [55, 58, 59]. The function of the *O*-linked sugar domain is unclear, although it has been suggested to be responsible for controlling receptor recycling and degradation [60, 61].

VLDLRs of a few teleost fish species were previously characterized and showed a very high degree of amino acid identity to *Xenopus* [62] or chicken [54] VLDLR sequences. Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) VLDLR was identified by ligand blotting and showed cross-reactivity with the chicken and *Xenopus* systems, both in terms of ligand recognition and immunoreactivity. In addition, its ligand-binding activity is inhibited by the polyanionic drug suramin [63], a property also demonstrated by other receptors of the lipoprotein receptor superfamily in oviparous animals [23]. The biochemical characterization of VLDLR from white perch revealed a specific and saturable binding of autologous Vtg to extracts of ovarian membranes displaceable by chicken egg yolk VLDL and having sensitivity to suramin [64]. Molecular cloning of VLDLR cDNA from rainbow trout resulted in the characterization of a 97-kDa protein containing a ligand-binding domain with eight LA repeats, lacking an *O*-linked sugar domain, and putatively endocytically active via an FDNVY motif in the cytoplasmic domain [38]. The molecular characterization of a homologous receptor in both white perch [64, 65] and tilapia [66] demonstrated, as in rainbow trout, the presence of an ovarian lipoprotein receptor with eight LA repeats, lacking an *O*-linked sugar domain, and highly expressed in the ovaries, as previously demonstrated in chicken. A second cDNA, differing by a stretch of 105 nucleotides encoding an *O*-linked sugar

domain, has been identified in rainbow trout and was expressed, in addition to the ovary, in muscles, liver, spleen, heart, and intestine [67]. PCR-based evidence of the expression in several tissues of the two splice variants lacking or containing 20 residues in the region normally corresponding to an *O*-linked sugar domain was obtained in tilapia [66]. Consistent with these findings, our data demonstrated the presence, in Senegalese sole ovaries, of two VLDLR isoforms with high sequence similarity to human VLDLR and chicken VLDLR/VtgR/LR8, one containing the *O*-linked sugar domain and the other not containing it. There was a higher proportion of the shorter transcript variant in the ovaries, a variant that was detected in low amounts in adipose tissue, heart, liver, kidneys, muscles, and testicles, whereas the longer variant was also significantly found in ovaries, adipose tissue, and heart. The isoform with a putative *O*-linked sugar domain found in ovarian and extraovarian tissues might contribute to the clearance of VLDL, a lipoprotein class containing apolipoprotein B (apoB) in teleost fish [68, 69], similarly to tetrapod vertebrate species, and present at high plasma concentrations in previtellogenic and early vitellogenic stages in rainbow trout [70]. The ligand-binding properties of the LA repeats of the tilapia VLDLR were tested in a semiquantitative yeast two-hybrid protein-protein interaction system that revealed the critical properties of the first three LA repeats in the Vtg binding region containing a motif known to be homologous to positively charged LR-binding motifs in mammalian apoB-100 and apolipoprotein E (apoE) [66]. These LA clusters are thought to participate in the binding of lipoprotein(s) via positively charged residues on apoB-100 or apoE [22]. The lack of the *O*-linked sugar domain did not affect the binding of the receptor to its ligands [66]. This receptor-binding domain was also detected by sequence homology in teleost fish apoB [71] and apoE [72, 73], the latest apolipoprotein not being detected in birds [23].

In situ hybridization studies performed on ovarian sections of Senegalese sole showed a high *vldlr* transcript level during previtellogenesis, and qPCR data demonstrated a significant positive correlation between *vldlr* transcript level and percentage of previtellogenic oocytes. Expression of *bactin* also had a significant positive correlation with the percentage of previtellogenic oocytes, thus hampering its use as a reference gene under these conditions. The nucleoli storage of *vldlr* mRNA during previtellogenesis, the disappearance of the hybridization signal in vitellogenic oocyte, and the significant negative correlation between *vldlr* transcript levels and the percentage of vitellogenic oocytes indicate, as previously suggested in rainbow trout [32] and chicken [74], that VLDLR is translated predominantly at early stages of oocyte development and is stored inside the cytoplasm to be gradually mobilized and recycled to the oocyte surface after the appearance of Vtg in the plasma (i.e., during the vitellogenic growth phase). The very low level of *vldlr* mRNA at the end of folliculogenesis was supported by qPCR data obtained in white perch [65] and by the absence of such transcript from the transcriptome of zebrafish fully grown ovarian follicles as determined by serial analysis of gene expression [47]. Data obtained in the present study also revealed that *vldlr* transcript hybridization signal was not detected in atretic follicles nor their levels, assessed by qPCR, correlated with percentage of atresia. These results indicate that *vldlr* transcript level may be used as a precocious functional molecular marker of the number of oocytes recruited for vitellogenesis.

Follicle atresia in diverse vertebrate species has been shown to result from apoptotic cell death initiated within the granulosa cell population [7, 8], or it may originate from apoptosis

initiated first in the oocyte [8, 75]. It has been demonstrated that fish oocytes produce factors that modulate follicular functions and that proteolysis through lysosomal enzymes of oocyte yolk proteins may lead to follicular atresia [12, 76] without a widespread follicular apoptosis [12]. There is a preliminary report of choriolysin expression during atresia of white perch, which might be related to degradation of the zona radiata [77]. As atresia advances, the yolk content of the atretic follicles is gradually digested and reabsorbed, resulting in the formation of corpora atretica and aggregates primarily composed of pigments and oxidized lipids [1, 4, 35]. A massive transfer of some yolk proteins and possibly lipids, combined with high-density lipoproteins in the bloodstream, has been demonstrated in rainbow trout [34] and chicken [78] during the course of follicular atresia.

FABPs are a group of low-molecular weight (14–15 kDa) cytoplasmic proteins belonging to the conserved multigene family of intracellular lipid-binding proteins. Together with two other families of ligand-binding proteins, lipocalins and avidins, FABPs form part of an overall structural superfamily: calycins [79]. In mammals, at least nine different FABP types have been identified, with tissue-specific distribution [25, 26, 80, 81] and distinct patterns of fatty acid interactions [82, 83]. They are generally named after the tissue in which they were discovered or are prominently expressed. However, their expression is not exclusive, and more than one FABP may be found in a given cell or tissue, so a numerical nomenclature has been introduced to distinguish among the various FABP genes [84]. An additional type (FABP10) was recently characterized in nonmammalian species, including teleost fish [26, 85]. Our BI analysis demonstrated that all FABP protein subfamilies found in teleost fish correspond to the human subfamilies, with the exception of a single FABP subfamily, clustered in a sister group of tetrapod FABP4/FABP5/FABP8/FABP9, which is found only in teleost fish and is named here FABP11. The *S. senegalensis* Fabp sequence characterized in this study is part of this newly defined FABP11 subfamily, which also includes sequences previously characterized from Antarctic teleost fish species [86].

FABPs are ubiquitously expressed in vertebrate and nonvertebrate tissues, with distinct expression patterns for individual FABPs [25, 87]. The primary role of all FABP family members is to regulate fatty acid uptake and intracellular transport. Other known functions are targeting fatty acids to specific metabolic pathways and involvement in regulating gene expression and cell growth [25, 26]. Rat ovaries express FABP2 and FABP3, as demonstrated by their immunohistochemical localization in interstitial cells of the theca interna [27], in somatic cells during postnatal development and in immature ovaries treated with gonadotropins [28]. In this species, *fabp3* expression was downregulated and *fabp5* expression was upregulated in theca cells of the rat ovary after human chorionic gonadotropin administration [31]. Immunodetection performed on mice ovaries revealed FABP3 in interstitial gland cells and theca cells [29], FABP4 in apoptotic granulosa cells of atretic antral follicles [30], and FABP5 in a specific population of ovarian macrophages in advanced atretic follicles [29].

It has been shown that zebrafish *fabp3* mRNA was abundant and restricted to the ooplasm of previtellogenic oocytes [33], whereas a low level of this transcript was detected in the transcriptome of fully grown ovarian follicles [47]. Our data indicated that sole *fabp11* transcript was highly expressed in the ovaries, liver, and adipose tissue, and to a lower extent in heart, muscles, kidneys, and testicles. In situ hybridization analysis demonstrated that sole *fabp11* transcript is expressed

in previtellogenic oocytes, whereas no hybridization signal was detected in the larger oocytes. However, contrary to *vldlr* mRNA, a very strong *fabp11* hybridization signal was detected in the somatic layers of atretic follicles. Furthermore, a significant linear-positive correlation between sole *fabp11* transcript level and the percentage of atresia in ovarian samples was demonstrated by qPCR. This high transcript level has been identified in hypertrophied somatic cells during oocyte fragmentation, follicular cell invasion of the space occupied by the oocyte and elimination of cellular remnants, and degeneration of atretic follicles. These cells may have also a high content of cellular nucleic acid-binding protein, as previously shown in degenerating and atretic follicles of zebrafish ovary [88]. During the process of follicular atresia in mice, the invasive granulosa cells found between the zona pellucida and the oocyte may have a macrophage-like cell function for the elimination of oocytes from atretic follicles [89]. Additional studies are needed to determine the nature and origin of the numerous invasive *fabp11*-expressing cells found into the Senegalese sole atretic follicles. FABPs undoubtedly play an essential role in cellular fatty acid transport and utilization. In the vertebrate ovary, a differential role of FABP subtypes may be related to the changes in the efficient uptake, intracellular transport, and utilization of fatty acids accompanying folliculogenesis, atresia, and hormone synthesis. High expression levels of *fabp11* transcripts in somatic cells of atretic follicles suggest the possible importance of lipid-metabolic processes and involvement of Fabp11 and/or its ligand fatty acids in the process of follicular atresia.

In conclusion, the present study has shown that the quantification of *vldlr* and *fabp11* transcripts by qPCR may allow, through linear regression analysis, determination of the percentage of oocytes recruited for vitellogenesis and those undergoing atresia. These markers may undoubtedly help to identify factors that may be involved in the regulation of follicular growth and degeneration in the teleost fish ovary and would help improve breeding conditions to reduce stress leading to atresia in female ovaries, as well as improve the understanding of the reproductive biology of reared stocks.

## ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank Anja Knoll-Gellida for advice. Fish maintenance by Josep Ll. Celades and Joaquín Canoura is gratefully acknowledged.

## REFERENCES

1. Saidapur SK. Follicular atresia in the ovaries of nonmammalian vertebrates. *Int Rev Cytol* 1978; 54:225–244.
2. Nagahama Y. The functional morphology of the teleost gonad. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (eds.), *Fish Physiology*, vol. IX, chapter 6. Reproduction, Part A: Endocrine Tissues and Hormones. Academic Press; 1983:223–275.
3. Nagahama Y. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J Dev Biol* 1994; 38:217–229.
4. Guraya SS. The cell and molecular biology of fish oogenesis. In: Sauer HW (ed.), *Monographs in Developmental Biology*, vol. 18, chapter VIII. Karger, Basel; 1986:169–180.
5. Kling D. Total atresia of the ovaries of *Tilapia leucosticta* (Cichlidae) after intoxication with the insecticide Lebaycid. *Experientia* 1981; 37:73–74.
6. Van Den Belt K, Wester PW, Van Der Ven LTM, Verheyen R, Witters H. Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. *Environ Toxicol Chem* 2002; 21:767–775.
7. Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:349–363.
8. Morita Y, Perez GI, Maravei DV, Tilly KI, Tilly JL. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis in vitro. *Mol Endocrinol* 1999; 13:841–850.



9. Matova N, Cooley L. Comparative aspects of animal oogenesis. *Dev Biol* 2001; 231:291–320.
10. Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update* 2005; 11:162–177.
11. Janz DM, Van Der Kraak G. Suppression of apoptosis by gonadotropin, 17beta-estradiol, and epidermal growth factor in rainbow trout preovulatory ovarian follicles. *Gen Comp Endocrinol* 1997; 105:186–193.
12. Wood AW, Van Der Kraak GJ. Apoptosis and ovarian function: novel perspectives from the teleosts. *Biol Reprod* 2001; 64:264–271.
13. Janz DM, McMaster ME, Munkittrick KR, Van der Kraak G. Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 147:391–398.
14. Uchida D, Yamashita M, Kitano T, Iguchi T. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2004; 137:11–20.
15. Wood AW, Van Der Kraak G. Yolk proteolysis in rainbow trout oocytes after serum-free culture: evidence for a novel biochemical mechanism of atresia in oviparous vertebrates. *Mol Reprod Dev* 2003; 65:219–227.
16. Andreu-Vieyra CV, Habibi HR. Factors controlling ovarian apoptosis. *Can J Physiol Pharmacol* 2000; 78:1003–1012.
17. Habibi HR, Andreu-Vieyra C, Mirhadi E. Functional significance of gonadal gonadotropin-releasing hormone. In: Goos HJTH, Rastogi RK, Vaudry H, Pierantoni R (eds.), *Perspective in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity*. Bologna, Italy: Munduzzi Editore; 2001:959–968.
18. Wallace RA. Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates. In: Browder LW (ed.), *Developmental Biology*. New York: Plenum Press; 1985:127–177.
19. Mommsen PT, Walsh PJ. Vitellogenesis and oocyte assembly. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (eds.), *Fish Physiology*, vol. 11A. New York: Academic Press; 1988:347–406.
20. Tyler CR, Sumpter JP. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev Fish Biol Fish* 1996; 6:289–318.
21. Wiegand MD. Composition, accumulation and utilization of yolk lipids in teleost fish. *Rev Fish Biol Fish* 1996; 6:259–286.
22. Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:535–562.
23. Schneider WJ, Nimpf J, Brandes C, Drexler M. Low-density lipoprotein receptor family: genetics, function, and evolution. *Curr Atheroscler Rep* 1999; 1:115–122.
24. Schneider WJ, Nimpf J. LDL receptor relatives at the crossroad of endocytosis and signaling. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:892–903.
25. Zimmerman AW, Veerkamp JH. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59:1096–1116.
26. Haunerland NH, Spener F. Fatty acid-binding proteins—insights from genetic manipulations. *Prog Lipid Res* 2004; 43:328–349.
27. Watanabe M, Ono T, Kondo H. Immunohistochemical studies on the localisation and ontogeny of heart fatty acid binding protein in the rat. *J Anat* 1991; 174:81–95.
28. Iseki I, Amano O, Fujii H, Kanda T, Ono T. Immunohistochemical localization of two types of fatty acid-binding protein in rat during postnatal development and in immature rat ovaries treated with gonadotropins. *Anat Rec* 1995; 241:235–243.
29. Nourani MR, Owada Y, Kitanaka N, Abdelwahab SA, Iwasa H, Sakagami H, Spener F, Kondo H. Localization of epidermal-type fatty acid binding protein in macrophages in advanced atretic follicles of adult mice. *J Mol Hist* 2005; 36:391–400.
30. Nourani MR, Owada Y, Kitanaka N, Sakagami H, Hoshi H, Iwasa H, Spener F, Kondo H. Occurrence of immunoreactivity for adipocyte-type fatty acid binding protein in degenerating granulosa cells in atretic antral follicles of mouse ovary. *J Mol Hist* 2005; 36:491–497.
31. Leo CP, Pisarska MD, Hsueh AJ. DNA array analysis of changes in preovulatory gene expression in the rat ovary. *Biol Reprod* 2001; 65:269–276.
32. Perazzolo LM, Coward K, Davail B, Normand E, Tyler CR, Pakdel F, Schneider WJ, Le Menn F. Expression and localization of messenger ribonucleic acid for the vitellogenin receptor in ovarian follicles throughout oogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biol Reprod* 1999; 60:1057–1068.
33. Liu RZ, Denovan-Wright EM, Wright JM. Structure, linkage mapping and expression of the heart-type fatty acid-binding protein gene (*fabp3*) from zebrafish (*Danio rerio*). *Eur J Biochem* 2003; 270:3223–3234.
34. Babin PJ. Apolipoproteins and the association of egg yolk proteins with plasma high density lipoproteins after ovulation and follicular atresia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J Biol Chem* 1987; 262:4290–4296.
35. Blazer VS. Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiol Biochem* 2002; 26:85–101.
36. Agulleiro MJ, Anguis V, Cañavate JP, Martínez-Rodríguez G, Mylonas CC, Cerdà J. Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. *Aquaculture* 2006; 257:511–524.
37. García-López A, Couto E, Canario AVM, Sarasquete C, Martínez-Rodríguez G. Ovarian development and plasma sex steroid levels in cultured female Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2007; 146:342–354.
38. Davail B, Pakdel F, Bujo H, Perazzolo LM, Waclawek M, Schneider WJ, Le Menn F. Evolution of oogenesis: the receptor for vitellogenin from the rainbow trout. *J Lipid Res* 1998; 39:1929–1937.
39. André M, Ando S, Ballagny C, Durliat M, Poupard G, Briançon C, Babin PJ. Intestinal fatty acid binding protein gene expression reveals the cephalocaudal patterning during zebrafish gut morphogenesis. *Int J Dev Biol* 2000; 44:249–252.
40. Marza E, Barthe C, Andre M, Villeneuve L, Helou C, Babin PJ. Developmental expression and nutritional regulation of a zebrafish gene homologous to mammalian microsomal triglyceride transfer protein large subunit. *Dev Dyn* 2005; 232:506–518.
41. Avarre JC, Lubzens E, Babin PJ. Apolipoprotein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipoprotein II/I and vertebrate apolipoprotein B. *BMC Evol Biol* 2007; 7:3.
42. Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O. PHYML Online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:W557–W559.
43. Abascal F, Zardoya R, Posada D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* 2005; 21:2104–2105.
44. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 2003; 19:1572–1574.
45. Morais S, Knoll-Gellida A, André M, Barthe C, Babin PJ. Conserved expression of alternative splicing variants of peroxisomal *acyl-CoA oxidase 1* in vertebrates and developmental and nutritional regulation in fish. *Physiol Genomics* 2007; 28:239–252.
46. Bogerd J, Babin PJ, Kooiman FP, André M, Ballagny C, Van Marrewijk WJA, Van der Horst D. Molecular characterization and gene expression in the eye of the apolipoprotein II/I precursor from *Locusta migratoria*. *J Comp Neurol* 2000; 427:546–558.
47. Knoll-Gellida A, André M, Gattegno T, Forgue J, Admon A, Babin PJ. Molecular phenotype of zebrafish ovarian follicle by serial analysis of gene expression and proteomic profiling, and comparison with the transcriptomes of other animals. *BMC Genomics* 2006; 7:46.
48. Fernandez-Trujillo MA, Porta J, Borrego JJ, Alonso MC, Alvarez MC, Bejar J. Cloning and expression analysis of Mx cDNA from Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Fish Shellfish Immunol* 2006; 21:577–582.
49. Yuan JS, Reed A, Chen F, Steward CN Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 2006; 7:85.
50. Lee PD, Sladek R, Greenwood CMT, Hudson TJ. Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. *Genome Res* 2002; 12:292–297.
51. Hill AA, Brown EL, Whitley MZ, Tucker-Kellogg G, Hunter CP, Slonim DK. Evaluation of normalization procedures for oligonucleotides array data based on spiked cRNA controls. *Genome Biol* 2001; 2:0055.1–0055.13.
52. Van de Peppel J, Kemmeren P, van Bakel H, Radonjic M, van Leenen D, Holstege FC. Monitoring global messenger RNA changes in externally controlled microarrays experiments. *EMBO Rep* 2003; 4:387–393.
53. Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Nakatsu N, Ono A, Kodama Y, Nagao T. “Per cell” normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genomics* 2006; 7:64.
54. Bujo H, Hermann M, Kaderli MO, Jacobsen L, Sugawara S, Nimpf J, Yamamoto T, Schneider WJ. Chicken oocyte growth is mediated by an eight ligand binding repeat member of the LDL receptor family. *EMBO J* 1994; 13:5165–5175.
55. Bujo H, Yamamoto T, Hayashi K, Hermann M, Nimpf J, Schneider WJ. Mutant oocytic low density lipoprotein receptor gene family member causes atherosclerosis and female sterility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:9905–9999.
56. Perry MM, Gilbert AB. Yolk transport in the ovarian follicle of the hen (*Gallus domesticus*): lipoprotein-like particles at the periphery of the oocyte in the rapid growth phase. *J Cell Sci* 1979; 39:257–272.
57. Takahashi S, Kawarabayashi Y, Nakai T, Sakai J, Yamamoto T. Rabbit very low density lipoprotein receptor: a low density lipoprotein receptor-like protein with distinct ligand specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:9252–9256.

58. Bujo H, Lindstedt KA, Hermann M, Dalmau LM, Nimpf J, Schneider WJ. Chicken oocytes and somatic cells express different splice variants of a multifunctional receptor. *J Biol Chem* 1995; 270:23546–23551.
59. Nimpf J, Schneider WJ. The VLDL receptor: an LDL receptor relative with eight ligand binding repeats, LR8. *Atherosclerosis* 1998; 141:191–202.
60. Iijima H, Miyazawa M, Sakai J, Magoori K, Ito MR, Suzuki H, Nose M, Kawarabayasi Y, Yamamoto TT. Expression and characterization of a very low-density lipoprotein receptor variant lacking the O-linked sugar region generated by alternative splicing. *J Biochem* 1998; 124:747–755.
61. Magrané J, Casaroli-Marano RP, Reina M, Gáfvels M, Vilaró S. The role of O-linked sugars in determining the very low-density lipoprotein receptor stability or release from the cell. *FEBS Lett* 1999; 451:56–62.
62. Okabayashi K, Shoji H, Nakamura T, Hashimoto O, Asashima M, Sugino H. cDNA cloning and expression of the *Xenopus laevis* vitellogenin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 224:406–413.
63. Stifani S, Le Menn F, Rodriguez JN, Schneider WJ. Regulation of oogenesis: the piscine receptor for vitellogenin. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1045:271–279.
64. Tao Y, Berlinsky DL, Sullivan CV. Characterization of a vitellogenin receptor in white perch (*Morone americana*). *Biol Reprod* 1996; 55: 646–656.
65. Hiramatsu N, Chapman RW, Lindzey JK, Haynes MR, Sullivan CV. Molecular characterization and expression of vitellogenin receptor from white perch (*Morone americana*). *Biol Reprod* 2004; 70:1720–1730.
66. Li A, Sadasivam M, Ding JL. Receptor-ligand interaction between vitellogenin receptor (VtGR) and vitellogenin (Vtg), implications on low-density lipoprotein receptor and apolipoprotein B/E. *J Biol Chem* 2003; 278:2799–2806.
67. Prat F, Coward K, Sumpter JP, Tyler CR. Molecular characterization and expression of two ovarian lipoprotein receptors in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Biol Reprod* 1998; 58:1146–1153.
68. Babin PJ. Plasma lipoproteins and apolipoproteins distribution as a function of density in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Biochem J* 1987; 246:425–429.
69. Babin PJ, Vernier JM. Plasma lipoproteins in fish: a review. *J Lipid Res* 1989; 30:467–489.
70. Wallaert C, Babin PJ. Age-related, sex-related and seasonal changes of plasma lipoprotein concentrations in trout. *J Lipid Res* 1994; 35: 1619–1633.
71. Babin PJ, Deryckere F, Gannon F. Presence of an extended duplication in the low density lipoprotein receptor-binding domain of apolipoprotein B. Cloning and characterization of the domain in salmon. *Eur J Biochem* 1995; 230:45–51.
72. Durliat M, André M, Babin PJ. Conserved protein motifs and structural organization of a fish gene homologous to mammalian apolipoprotein E. *Eur J Biochem* 2000; 267:549–559.
73. Poupard G, André M, Durliat M, Ballagny C, Bœuf G, Babin PJ. Apolipoprotein E gene expression correlates with endogenous lipid nutrition and yolk syncytial layer lipoprotein synthesis during fish development. *Cell Tissue Res* 2000; 300:251–261.
74. Shen X, Steyrer E, Retzek H, Sanders EJ, Schneider WJ. Chicken oocyte growth: receptor-mediated yolk deposition. *Cell Tissue Res* 1993; 272: 459–471.
75. Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001; 122:829–838.
76. Wang Y, Ge W. Spatial expression patterns of activin and its signaling system in the zebrafish ovarian follicle: evidence for paracrine action of activin on the oocytes. *Biol Reprod* 2003; 69:1998–2006.
77. Donato DM, Hiramatsu N, Arey KM, Hiramatsu K, Donato DM, Kennedy AM, Morton CL, Hara A, Sullivan CV. Atresia in temperate basses: cloning of hatching enzyme (choriolyisin) homologues from atretic ovaries. *Fish Physiol Biochem* 2003; 28:329–330.
78. Walzem RL, Davis PA, Hansen RJ. Overfeeding increases very low density lipoprotein diameter and causes the appearance of a unique lipoprotein particle in association with failed yolk deposition. *J Lipid Res* 1994; 35:1354–1366.
79. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and evolution. *Biochem J* 1996; 318:1–14.
80. Storch J, Thumser AEA. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1486:28–44.
81. Chmurzynska A. The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *J Appl Genet* 2006; 47: 39–48.
82. Richieri GV, Ogata RT, Zimmerman AW, Veerkamp JH, Kleinfeld AM. Fatty acid binding proteins from different tissues show distinct patterns of fatty acid interactions. *Biochem* 2000; 39:7197–7204.
83. Hanhoff T, Lücke C, Spener F. Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins. *Mol Cell Biochem* 2002; 239:45–54.
84. Hertz AV, Bernlohr DA. The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11:175–180.
85. Sharma MK, Liu RZ, Thisse C, Thisse B, Denovan-Wright EM, Wright JM. Hierarchical subfunctionalization of fabp1a, fabp1b and fabp10 tissue-specific expression may account for retention of these duplicated genes in the zebrafish (*Danio rerio*) genome. *FEBS J* 2006; 273:3216–3229.
86. Vayda ME, Londraville RL, Cashion RE, Costello L, Sidell BD. Two distinct types of fatty acid-binding protein are expressed in heart ventricle of Antarctic teleost fishes. *Biochem J* 1998; 330:375–382.
87. Esteves A, Ehrlich R. Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2006; 142:262–274.
88. Liu JX, Gui JF. Expression pattern and developmental behaviour of cellular nucleic acid-binding protein (CNBP) during folliculogenesis and oogenesis in fish. *Gene* 2005; 356:181–192.
89. Kamo A, Araki Y, Maeda K, Watanabe H. Characteristics of invasive cells found in between zona pellucida and oocyte during follicular atresia in mice. *Zygote* 2004; 12:269–276.

# Treatment of GnRHa-implanted Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with 11-ketoandrostenedione stimulates spermatogenesis and increases sperm motility

Maria J. Agulleiro<sup>a,c</sup>, Alexander P. Scott<sup>d</sup>, Neil Duncan<sup>a,c</sup>,  
Constantinos C. Mylonas<sup>e</sup>, Joan Cerdà<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> IRTA Center of Aquaculture, 43540-Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain

<sup>b</sup> IRTA Lab IRTA-ICM, CSIC, Passeig Marítim 37-49, 08003-Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Reference Center in Aquaculture, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), Barrack Road, Weymouth, Dorset, DT4 8UB, UK

<sup>e</sup> Institute of Aquaculture, Hellenic Center for Marine Research, P.O. Box 2214, Heraklion 71003, Crete, Greece

Received 20 December 2006; received in revised form 9 February 2007; accepted 13 February 2007

Available online 20 February 2007

## Abstract

The effect of 11-ketoandrostenedione (OA) on plasma concentrations of sexual steroids and spermatogenesis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) implanted with gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) was investigated. Males were treated with saline (control) or with GnRHa implants ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) in the presence or absence of OA ( $2$  or  $7 \text{ mg kg}^{-1}$ ) during twenty eight days. Treatment with GnRHa alone slightly stimulated spermatogenesis and milt production with respect to controls, and this was associated with a transient elevation of plasma 11-ketotestosterone (11-KT) at day seven and an increase of  $5\beta$ -reduced metabolite(s) of 17,20 $\beta$ -dihydroxy-pregn-4-en-3-one (17,20 $\beta$ P) at day twenty eight. However, treatment with GnRHa+OA increased plasma concentrations of 11-KT and free+sulphated  $5\beta$ -reduced metabolites of 17,20 $\beta$ P at days seven, fourteen and twenty one. After twenty eight days, the testis of GnRHa+OA-treated fish showed a lower number of spermatogonia B and spermatocytes I, and a higher number of spermatids, than fish treated with GnRHa alone. In addition, the motility of spermatozoa produced by GnRHa+OA males was enhanced by 2-fold with respect to controls or GnRHa males. These results suggest that treatment of Senegalese sole with GnRHa+OA stimulates spermatogenesis resulting in more motile sperm. Such effects could be mediated by an increased synthesis of 11-KT and/or 17,20 $\beta$ P in the testis but further studies will be required to elucidate the specific mechanism involved.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Teleosts; Hormonal treatment; Plasma steroids; Progestagens; Testis

**Abbreviations:** 11-deoxycortisol, 17,21-dihydroxypregn-4-ene-3,20-dione; 17,20 $\beta$ P, 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxypregn-4-en-3-one; 17,20 $\alpha$ P, 17,20 $\alpha$ -dihydroxypregn-4-en-3-one; 20 $\beta$ S, 17,20 $\beta$ ,21-trihydroxypregn-4-en-3-one; FSH, Follicle stimulating hormone; GSI, gonadosomatic index; GnRHa, gonadotropin-releasing hormone agonist; OA, 11-ketoandrostenedione; 11-KT, 11-ketotestosterone; Lc, Leydig cells; LH, Luteinizing hormone; sl, Seminiferous lobule; st, Seminiferous tubule; Sc, Sertoli cells; SD, Sperm density; SMD, Sperm motility duration; Sg, Spermatogonia; Spc, Spermatocyte; Spd, Spermatid; Spz, Spermatozoa; T, Testosterone.

\* Corresponding author. Lab IRTA-ICM, Room B46, CMIMA-CSIC, Passeig Marítim, 37-49, 08003-Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 230 95 31; fax: +34 93 230 95 55.

E-mail address: [joan.cerda@irta.es](mailto:joan.cerda@irta.es) (J. Cerdà).

## 1. Introduction

The testicle of higher vertebrates performs two major tasks: the production of testosterone (T) and formation of haploid germ cells (spermatogenesis). During spermatogenesis, spermatogonia (Sg) located in the seminiferous lobules (sl) undergo meiosis, leading to primary spermatocytes (Spcl), then secondary spermatocytes (SpclI) and eventually to haploid spermatids (Spd), which differentiate into flagellated spermatozoa (Spz). Both T production and spermatogenesis are generally considered to be regulated by pituitary gonadotropins, with luteinizing hormone (LH) acting on the T-producing Leydig cells (Lc) located in the interstitium, and

follicle-stimulating hormone (FSH) affecting Sertoli cells (Sc) in the sl (Holdcraft and Braun, 2004). In addition, a number of different growth factors and cytokines play important paracrine roles to regulate testicular function in mammals (Petersen and Soder, 2006).

In teleosts, much less is known on the endocrine control of spermatogenesis but evidence available indicate that it is also regulated by FSH, LH and T, but also by 11-ketotestosterone (11-KT), which is considered the major androgen in the fish testis (Borg, 1994). The 11-KT, produced by interstitial Lc in response to gonadotropins, acts on Sc to stimulate all stages of spermatogenesis (Miura and Miura, 2003). The final stage of spermatogenesis (referred to as 'spermiation'), that principally involves the production of seminal fluid (required to assist the passage of Spz through the sperm ducts) and the acquisition of sperm motility, is believed to be controlled by C<sub>21</sub> steroids (progestagens) that might be secreted by Lc in response to LH (Nagahama, 1994; Miura and Miura, 2003; Vermeirssen et al., 2004). One particular steroid that has been implicated in the control of this process in teleosts is 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxypregn-4-en-3-one (17,20 $\beta$ P) — a steroid that is also involved in oocyte maturation in females. Plasma concentrations of 17,20 $\beta$ P have been found to raise during the time of spermiation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*; Baynes and Scott, 1985), herring (*Clupea harengus*; Carolsfeld et al., 1996; Scott et al., 1991), North Sea plaice (*Pleuronectes platessa*, Vermeirssen et al., 1998) and Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*; Vermeirssen et al., 2000). In the last three species, however, it is not so much 17,20 $\beta$ P itself that rises steeply in the plasma at the time of spermiation, but its conjugated (sulphated and glucuronidated) metabolites. These metabolites are 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,17,20 $\beta$ -triol, 5 $\beta$ -pregnane-3 $\beta$ ,17,20 $\beta$ -triol and 17,20 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -pregnan-3-one, and an assay has been developed that can measure these compounds (combined concentrations) in biological fluids (Scott et al., 1997).

Other progestagens have also been found in the gonads of teleosts. The most important is 17,20 $\beta$ ,21-trihydroxypregn-4-en-3-one (20 $\beta$ S), which has been shown to act as an oocyte maturation-inducing steroid in some teleosts (Trant and Thomas, 1989). This steroid also induces spermiation in the black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*; Yueh and Chang, 1997), and seems to bind to a specific sperm membrane receptor and stimulate sperm motility in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*; Thomas, 1999). In male dab (*Limanda limanda*), 17,20 $\alpha$ -dihydroxypregn-4-en-3-one (17,20 $\alpha$ P) was suggested, purely on the basis of its relative abundance in plasma, as the spermiation-inducing steroid in this species (Canario and Scott, 1991). In halibut, plasma 17,20 $\alpha$ P, possibly produced by sperm, highly increases following GnRH $\alpha$  treatment (Vermeirssen et al., 2004). Finally, the 17,21-dihydroxypregn-4-ene-3,20-dione (11-deoxycortisol) was shown to be a major product of the ovaries of Dover sole (*Solea solea*; Canario, 1991).

The Senegalese sole (*Solea senegalensis*), a flatfish of high interest for aquaculture, has a bilobulated testis that is much smaller than that of other flatfish; the gonadosomatic index (GSI) is  $\leq 0.1$  and there are only small morphological changes during the reproductive cycle (García-López et al., 2005, 2006a,b). In this species, spermatogenesis seems to be of semi-cystic type, i.e.,

Spc and Spd are released into the sl lumen where they differentiate into Spz, and production of a few tens of microliters of sperm is observed almost all-year around (García-López et al., 2005, 2006b; Cabrita et al., 2006). In captivity, however, spontaneous spawning of wild-caught fish may be associated with relatively low fertilization rates (45–63%; Anguis and Cañavate, 2005) depending on the holding conditions of the broodfish. In the F1 generation, the situation is worst since complete absence of egg fertilization is often observed (Agulleiro et al., 2006).

In fish, it is known that synthesis of 11-KT in the testis, as well as in extratesticular tissues, can occur from pregnenolone via progesterone, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, androstenedione, 11 $\beta$ -hydroxyandrostenedione and 11-ketoandrostenedione (OA) (Mayer et al., 1990a; Goos and Consten, 2002). Accordingly, castrated fish treated with OA show elevated plasma 11-KT levels and restored secondary sexual characteristics (Mayer et al., 1990b; Borg et al., 1993). Also, treatment of intact males with OA or 11-KT can promote testicular development (Goos and Consten, 2002). Therefore, in the present study we investigated whether the treatment of Senegalese sole males with gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH $\alpha$ ) in combination with OA might enhance plasma levels of sex steroids, germ cell development and milt production.

## 2. Methods

### 2.1. Fish and hormone treatments

Adult Senegalese sole, F1 generation (of 1–1.5 year-old), were reared from eggs spawned by different stocks of wild fish acclimated to captivity at the facilities of the CIFPA "El Toruño" (Puerto de Santa María, Cádiz, Spain). Selected fish were transported to the Center of Aquaculture-IRTA and maintained as described (Agulleiro et al., 2006) for approximately one year before starting the experiments. Fish were placed in 1500 l circular tanks (density 0.6–0.8 kg m<sup>-2</sup>) connected to a recirculated water system for the control of temperature, and maintained at constant photoperiod (13L:11D).

Approximately five months before hormone treatments were given, groups of males (0.79 $\pm$ 0.03 kg in weight) were maintained under a controlled temperature regime. This regime consisted of a decline of the temperature from 19.5 °C to 8.5 °C over two months starting in November, then level at 10 °C for approximately three weeks, followed by an increase back to 19.5–20 °C over approximately two months. After this treatment, when the temperature of the tanks was stable at 19.5–20 °C in March for two additional weeks, fish were treated with a single Ethylene-Vinyl Acetate (EVAc) implant (Mylonas and Zohar, 2001) containing saline (control) or 50  $\mu$ g kg<sup>-1</sup> [D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>, Net] GnRH $\alpha$  with or without another EVAc implant containing 2 or 7 mg kg<sup>-1</sup> OA (Sigma). The males were distributed between six tanks (two tanks per treatment;  $n=3$  fish per tank).

### 2.2. Determination of steroid concentration in plasma and testis

Before hormonal treatments were administered and once a week thereafter, fish were sedated with 500 ppm phenoxyethanol,



and approximately 0.5 ml of blood was extracted from the caudal vein with a heparinized syringe, centrifuged, and the plasma stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

Plasma levels of T and 11-KT were determined by commercial enzyme immunosorbent assay (EIA) as previously described (Rodríguez et al., 2000). The inter-assay coefficients of variation were 1.9% for T ( $n=6$ ), and 2.7% for 11-KT ( $n=6$ ). The intra-assay coefficients of variation (calculated from duplicate samples) were  $2.8\pm 0.2\%$  for T ( $n=6$ ), and  $10.0\pm 1.5\%$  for 11-KT ( $n=6$ ). The anti-11-KT commercial antibody employed shows 0.01% of cross-reactivity with OA as given by the supplier. The levels of plasma 11-KT determined by EIA were also confirmed by radioimmunoassay (RIA) following the protocol of Scott et al. (1984) (data not shown).

To determine circulating concentrations of free 17,20 $\beta$ P, 17,20 $\alpha$ P, 20 $\beta$ S, and 11-deoxycortisol, plasma samples (100  $\mu\text{l}$ ) were mixed with 400  $\mu\text{l}$  of distilled water and 4 ml of diethyl ether. The tubes were allowed to settle and the lower aqueous phase was frozen by dipping the tube into liquid nitrogen. The diethyl ether was poured into a glass tube and allowed to evaporate in a fume cupboard at  $45^{\circ}\text{C}$  in a water bath. The residue was then reconstituted in 1 ml of assay buffer, and steroid concentration determined by RIA (Scott et al., 1984, 1991; Scott and Sorensen, 1994). A further aliquot of plasma (20  $\mu\text{l}$ ) was subjected to acid solvolysis overnight at  $45^{\circ}\text{C}$  using 4 ml of a mixture of ethyl acetate and trifluoroacetic acid (100:1.4, v:v). After evaporation of solvent, the residue was redissolved in 1 ml assay buffer and the combined concentration of 17,20 $\beta$ P and its 5 $\beta$ -reduced metabolites measured against standard 5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,17,20 $\beta$ -triol (Scott et al., 1997).

Concentrations of free 17,20 $\beta$ P in testis were also measured by RIA. For this analysis, a piece of testis ( $102\pm 6$  mg) was homogenized in 400  $\mu\text{l}$  RIA buffer, incubated at  $60^{\circ}\text{C}$  for 30 min in a water bath, and centrifuged at 6000 rpm for 5 min at room temperature. The supernatant was transferred to new tubes and an equal volume of fresh buffer was added. The analysis was performed using duplicate amounts (100  $\mu\text{l}$ ) from this dilution. Water content of each testis was estimated gravimetrically to constant weight at  $60^{\circ}\text{C}$  using another piece of the same testis.

### 2.3. Histological analysis

After 4 weeks of treatment, fish were sacrificed, the testis removed and weighed, and the gonadosomatic index (GSI) calculated (gonad weight/body weight $\times 100$ ). A piece of the testis was fixed in modified Bouin solution (75% picric acid, 25% formaline) for 2 h, then dehydrated, embedded in paraplast (Sigma), and sectioned at 5  $\mu\text{m}$  and stained with eosin/hematoxylin or methylene blue/azure II/basic fuchsin.

The occurrence of sl, as well as of germinal and somatic cells, in the cortex of the testis was evaluated by light microscopy by using a Leica DMLB light microscope. The number of sl and clusters of Lc per  $\text{mm}^2$ , as well as the number of Lc per cluster, were determined in 5 different transversal sections of the cortical area of the testis of each male. The number of Sc and of SgA, SgB, SpcI, SpcII, and Spd was scored on at least five different sl

in each section. For Spz, the number of cells per seminiferous tubule (st) was also counted on at least 5 different tubules in each section.

### 2.4. Determination of sperm density and motility

To avoid stressing the fish, the amount of milt produced, the sperm density (SD) and the sperm motility duration (SMD) were determined directly from the testis after sacrifice of the fish at the end of the experiment. The sperm was collected from the whole dorsal testis that was two half sectioned and gently pressed. The volume of milt was then measured by using a micropipette. With this method, milt free of urine could be obtained. The SD was determined on 50- to 100-fold diluted milt samples using a haemocytometer and a Leica DMLB light microscope. The dilution was performed in sperm buffer (150 mM NaCl, 15.2 mM KCl, 1.3 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.6 mM  $\text{MgCl}_2$ , buffered with 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ –NaOH at pH 8.2). To measure the SMD, milt samples were diluted 10-fold in filtered seawater and immediately viewed at  $200\times$  magnification under the microscope. The SMD was defined as the time interval from activation to the cessation of all Spz movement (Lim et al., 2004). The morphology of the Spz was examined on a sample of milt diluted 1000-fold with sperm buffer, and the diameter and length of the head and tail, respectively, were measured by using the image analysis software AnalySIS (SIS GmbH, Germany).

### 2.5. Statistics

Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.). The data on plasma steroid levels were statistically analyzed by two-factor analysis of variance (ANOVA), after log-transformation of the data when needed, where the treatments and sampling days were the potential interacting factors (Cobb, 1998). When interaction between factors was statistically significant, post hoc comparisons were performed following the Tukey's multiple-range test. The data collected at the end of the experiment were analyzed by one-factor ANOVA. In all cases, differences were considered significant at  $P<0.05$ .

## 3. Results

To test whether OA could enhance the effect of GnRHa on spermatogenesis in Senegalese sole, males maintained under a controlled temperature regime were treated with saline (control) or with 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  GnRHa, with or without another implant containing 2 or 7  $\text{mg kg}^{-1}$  OA. Plasma concentrations of T and 11-KT were determined weekly (Fig. 1). Plasma T did not increase after day seven of GnRHa treatment, but decreased significantly (two-way ANOVA;  $P<0.05$ ) at day fourteen in all three GnRHa-treated groups (Fig. 1A). In control males, however, T decreased ( $P<0.05$ ) one week later at day twenty one, reaching similar levels to those of hormone-treated fish from that day onwards. In contrast, one week after the hormonal treatments were given, 11-KT in fish implanted with GnRHa, treated or not

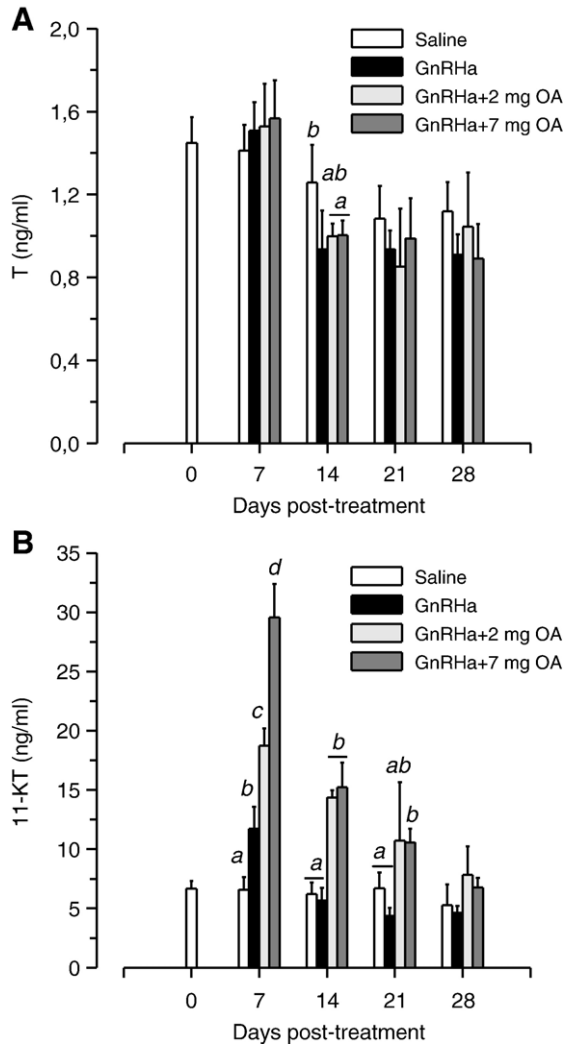


Fig. 1. Plasma levels of T (A) and 11-KT (B) of males treated with saline or GnRH $\alpha$  ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) in combination with different doses of OA ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ , or  $7 \text{ mg kg}^{-1}$ ) during the different sampling days. Data are the mean  $\pm$  SEM ( $n=4-6$  fish). Different letters on top of the bars indicate values statistically different ( $P<0.05$ ) between treatments at a given sampling day after two-way ANOVA analysis followed by the Tukey's multiple-range test.

with OA, increased significantly (two-way ANOVA;  $P<0.05$ ), while in control fish 11-KT remained unchanged (Fig. 1B). However, fish treated with GnRH $\alpha$ +OA showed higher ( $P<0.05$ ) 11-KT than those implanted with GnRH $\alpha$  alone, the highest concentrations of 11-KT being detected in males treated with GnRH $\alpha$ + $7 \text{ mg kg}^{-1}$  OA. At day fourteen, 11-KT in fish implanted with GnRH $\alpha$  alone returned to similar levels to those in the controls, while the groups treated with GnRH $\alpha$ +OA still had higher ( $P<0.05$ ) 11-KT concentrations, although they appeared to decrease with respect to those at day seven (Fig. 1B). During subsequent weeks, 11-KT in fish treated with GnRH $\alpha$ +OA progressively diminished, and by day twenty eight the concentrations of 11-KT were similar between all the experimental groups.

In order to investigate whether the GnRH $\alpha$  and OA treatments could enhance the production of  $C_{21}$  steroids potentially involved in the maturation of the sperm, plasma concentrations of  $17,20\beta\text{P}$ ,  $17,20\alpha\text{P}$ , 11-deoxycortisol,  $20\beta\text{S}$  and of free+

sulphated  $17,20\beta\text{P}$  and its  $5\beta$ -reduced metabolites were analyzed. Regardless of the hormonal treatment, the plasma levels of free  $17,20\beta\text{P}$ ,  $17,20\alpha\text{P}$ , 11-deoxycortisol and  $20\beta\text{S}$  were below  $1 \text{ ng ml}^{-1}$  throughout the course of the experiment (data not shown). In the case of  $17,20\beta\text{P}$ , for instance, 43% of the samples had values between  $0.9 \text{ ng ml}^{-1}$  and  $0.2 \text{ ng ml}^{-1}$  (the limit of detection of the assay — which is related to the volume of plasma that is extracted and the volume of buffer in which the extract is redissolved) and 57% were below  $0.2 \text{ ng ml}^{-1}$ . However, since there was no discernible pattern in the values (i.e. no differences between groups were detected), it was decided unnecessary to re-assay the samples under more sensitive conditions. In contrast, free+sulphated  $17,20\beta\text{P}$   $5\beta$ -reduced metabolites were more readily detectable in most fish, and in some groups they changed significantly during the course of the experiment (Fig. 2). Thus, the group treated with GnRH $\alpha$ + $7 \text{ mg kg}^{-1}$  OA showed a significant (two-way ANOVA;  $P<0.05$ ) increase of free+sulphated  $17,20\beta\text{P}$  metabolites from day seven onwards, while in the GnRH $\alpha$  and GnRH $\alpha$ + $2 \text{ mg kg}^{-1}$  OA groups these metabolites significantly ( $P<0.05$ ) increased later at day twenty eight, but they reached similar concentrations to those observed in the GnRH $\alpha$ + $7 \text{ mg kg}^{-1}$  OA fish. In contrast, the concentrations of free+sulphated  $17,20\beta\text{P}$  metabolites in plasma of control fish did not change during the experiment.

The previous observations suggested that  $17,20\beta\text{P}$  could be produced in testis, but then sulphated and probably metabolised to an extent that it was not directly measurable in plasma. To partially explore this hypothesis, the content of  $17,20\beta\text{P}$  in the testis at the end of the experiment was determined (Fig. 3). The results indicated that control fish had a mean concentration of  $17,20\beta\text{P}$  in the testis of  $28.2 \pm 4.8 \text{ ng g}^{-1}$  dry weight ( $n=6$ ).

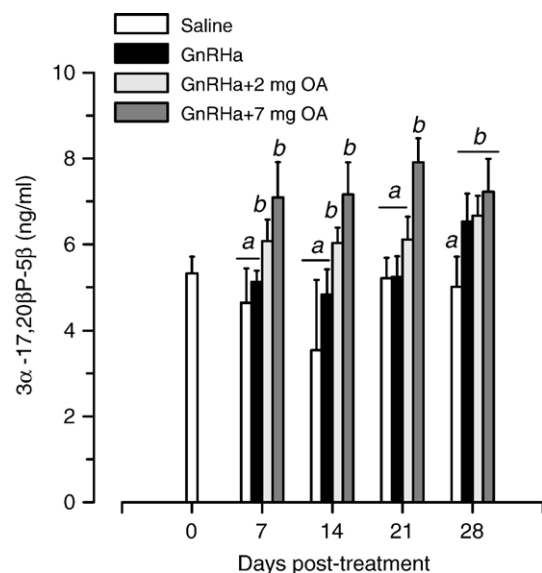


Fig. 2. Changes in plasma concentrations of free+sulphated  $17,20\beta\text{P}$  (standardized against  $5\beta$ -pregnane- $3\alpha,17,20\beta$ -triol;  $3\alpha-17,20\beta\text{P}-5\beta$ ) of males treated with saline or GnRH $\alpha$  ( $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) in combination with different doses of OA ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ , or  $7 \text{ mg kg}^{-1}$ ) during the different sampling days. Data are the mean  $\pm$  SEM ( $n=4-6$  fish). Different letters on top of the bars indicate values statistically different ( $P<0.05$ ) between treatments at a given sampling day after two-way ANOVA analysis followed by the Tukey's multiple-range test.

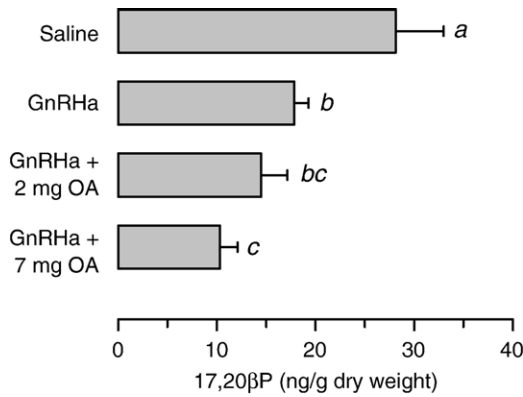


Fig. 3. Changes in the content of free 17,20β-dihydroxypregn-4-en-3-one (17,20βP) in the testis of males treated with either saline or GnRHa (50 μg kg<sup>-1</sup>) in combination with different doses of OA (2 mg kg<sup>-1</sup>, or 7 mg kg<sup>-1</sup>). Data are the mean ± SEM (n=4–6 fish). Different letters on the right side of the bars indicate values statistically different (one-way ANOVA; P<0.05).

However, GnRHa-treated males had lower (P<0.05) 17,20βP concentrations in testis than the controls, the males treated with GnRHa+7 mg kg<sup>-1</sup> OA having the lowest amount (10.3 ± 1.8 ng g<sup>-1</sup> dry weight; n=6). Thus, there appeared to be an inverse correlation between the content of free 17,20βP in testis and the concentration of free + sulphated 17,20βP metabolites in plasma.

The effect of the various treatments on spermatogenesis was further evaluated by histological examination of the testis (Table 1). In the Senegalese sole, this region of the gonad, the sl, is where the developing germ cells are located, as opposed

Table 1  
Somatic and germ cell development in the testis of Senegalese sole before and after treatment with GnRHa (50 μg kg<sup>-1</sup>) in the presence or absence of OA

	0 days		28 days		
	n		Saline	GnRHa+OA (mg kg <sup>-1</sup> )	
			0	2	7
n	3	6	6	4	6
GSI	0.07±0.1	0.07±0.01	0.07±0.00	0.06±0.01	0.05±0.01
sl mm <sup>-2</sup>	215±13 <sup>a</sup>	203±21 <sup>a</sup>	350±21 <sup>b</sup>	319±27 <sup>b</sup>	323±16 <sup>b</sup>
cLc mm <sup>-2</sup>	55±8 <sup>a</sup>	70±9 <sup>a</sup>	129±11 <sup>b</sup>	128±14 <sup>b</sup>	112±7 <sup>b</sup>
cLc sl <sup>-1</sup>	0.3±0.0	0.4±0.1	0.4±0.0	0.4±0.0	0.4±0.0
Lc c <sup>-1</sup>	8.2±0.6 <sup>a</sup>	8.8±0.4 <sup>ab</sup>	7.7±0.3 <sup>a</sup>	9.8±0.3 <sup>bc</sup>	11.2±0.7 <sup>c</sup>
Sc sl <sup>-1</sup>	1.3±0.6	0.8±0.1	0.9±0.4	0.7±0.2	0.5±0.2
SgA (%)	2.0±1.0	0.8±0.4	1.3±0.8	3.9±1.6	0.6±0.4
SgB (%)	14.0±4.5 <sup>a</sup>	12.2±2.6 <sup>a</sup>	6.1±2.3 <sup>b</sup>	6.5±2.3 <sup>b</sup>	1.5±0.8 <sup>c</sup>
Spcl (%)	19.5±2.1 <sup>a</sup>	23.6±4.2 <sup>a</sup>	12.6±3.0 <sup>b</sup>	8.0±1.7 <sup>b</sup>	2.9±1.3 <sup>c</sup>
Spcll (%)	0	0.5±0.2	0	0	0
Spd (%)	52.4±13.3 <sup>a</sup>	61.2±5.6 <sup>a</sup>	80.0±4.8 <sup>b</sup>	81.6±4.6 <sup>b</sup>	96.0±1.7 <sup>c</sup>
Spz st <sup>-1</sup>	0	40±8 <sup>a</sup>	102±33 <sup>b</sup>	81±27 <sup>b</sup>	25±9 <sup>a</sup>

Values were calculated only from the cortical area of the testis. For somatic cells, values indicate the number of seminiferous lobules (sl) per mm<sup>2</sup> (st mm<sup>-2</sup>), number of clusters of Leydig cells (Lc) per mm<sup>2</sup> (cLc mm<sup>-2</sup>), number of clusters of Lc per sl (cLc sl<sup>-1</sup>), number of Lc per cluster (Lc c<sup>-1</sup>), and number of Sertoli cells (Sc) per sl (Sc sl<sup>-1</sup>). For spermatogonia type A (SgA), spermatogonia type B (SgB), spermatocyte I (Spcl), spermatocyte II (Spcll), and spermatid (Spd), is indicated the percentage of each cell type per sl. For spermatozoa (Spz), the number of cells per seminiferous tubule (st) is indicated (Spz st<sup>-1</sup>).

Data are the mean ± SEM.

Values within a row with different superscript are statistically different (one-way ANOVA; P<0.05).

to the medullar region, which contains the efferent duct system that collects and stores the sperm (García-López et al., 2005). The analysis revealed that in all groups the GSI remained stable during the experiment. However, although fish from all experimental groups showed production of sperm on day twenty eight, differences in the occurrence of Lc and in the progression of spermatogenesis were observed. The GnRHa treatment, independently of the presence of OA, increased the number of sl per area of the testis, and this was associated with an increase of the number of clusters of Lc, so that the ratio between sl and clusters of Lc remained unchanged between treatments. However, the number of Lc per cellular cluster significantly (P<0.05) increased in the testis of males treated with GnRHa+7 mg kg<sup>-1</sup> OA with respect to those treated with GnRHa alone or saline. The spermatogenic process appeared to be stimulated in all three GnRHa-treated groups with respect to that in controls, since the percentage of SgB, Spcl and Spd per sl in the testis of GnRHa-treated fish were significantly (P<0.05) higher than those in the saline-treated fish. The males implanted with GnRHa+7 mg kg<sup>-1</sup> OA showed the most advanced stage of spermatogenesis, as indicated by the lowest percentage of SgB and Spcl and the highest proportion of Spd. According to the stimulatory effect by GnRHa, the number of Spz per st was higher in males treated with GnRHa alone or with GnRHa+2 mg kg<sup>-1</sup> OA than in control males. However, fish treated with GnRHa+7 mg kg<sup>-1</sup> OA showed the same amount of Spz per st as controls.

Following the euthanizing of the fish and the removal of the testis from each male at the end of the experiment, the production of milt by each group was evaluated (Table 2). The treatment with GnRHa alone or in combination with a low dose of OA significantly (P<0.05) increased the volume of milt produced with respect to the control males. Since there were no differences in the density of the sperm between the different treatments, the production of Spz by these groups appeared to be increased, in agreement with the histological results. In contrast, males implanted with GnRHa+7 mg kg<sup>-1</sup> OA had lower volumes of milt in the testis, in amounts similar to controls. However, determination of sperm motility after activation in seawater revealed that GnRHa+OA-treated males produced Spz that were

Table 2  
Effect of GnRHa (50 μg kg<sup>-1</sup>) with or without OA on milt production and sperm motility in the Senegalese sole

	n	Saline	GnRHa+OA (mg kg <sup>-1</sup> )		
		0	0	2	7
			6	6	4
Spermiating males	6	6	4	5	
Testis wet weight (g)		0.33±0.01	0.32±0.03	0.29±0.06	0.26±0.04
Milt volume (μl g <sup>-1</sup> testis wet weight)		13.1±2.4 <sup>a</sup>	33.1±5.5 <sup>b</sup>	40.1±14 <sup>b</sup>	11.1±3.1 <sup>a</sup>
SD (×10 <sup>9</sup> ml <sup>-1</sup> )		4.6±1.2	2.8±0.6	3.5±1.9	2.3±1.5
SMD (s)		241±29 <sup>a</sup>	232±14 <sup>a</sup>	450±53 <sup>b</sup>	486±51 <sup>b</sup>

SD (sperm density), SMD (sperm motility duration).

Data are the mean ± SEM. Before the experiment, production of sperm was not observed.

Values within a row with different superscript are statistically different (one-way ANOVA; P<0.05).



approximately twice as motile than those produced by the control and GnRH<sub>a</sub>-treated males, while there were no differences in the diameter and length of the head and tail, respectively, of the Spz produced by the different groups (data not shown).

#### 4. Discussion

Treatment of flatfish with GnRH<sub>a</sub> generally increases plasma concentrations of androgens (Harmin and Crim, 1993; Vermeirssen et al., 1998, 2000; Pankhurst and Poortenaar, 2000; Moon et al., 2003; Agulleiro et al., 2006), C<sub>21</sub> steroids, milt hydration (Vermeirssen et al., 1998, 2004; Martin-Robichaud et al., 2000; Tvedt et al., 2001; Moon et al., 2003; Lim et al., 2004) and/or sperm motility (Clearwater and Crim, 1998; Vermeirssen et al., 2004). However, in F1 specimens of Senegalese sole, as well as in some other species, attempts to enhance milt production by using GnRH<sub>a</sub> implants have been unsuccessful, even though androgen plasma levels may be transiently increased following GnRH<sub>a</sub> treatment (e.g., Berlinsky et al., 1996, 1997; Agulleiro et al., 2006). Such reproductive dysfunction might be related to impaired spermatogenesis and/or spermiation after a long period in captivity. A similar situation has been observed in North Sea plaice, in which captive males produce abnormally dense milt and have plasma concentrations of sex steroids that are 100 times lower (Vermeirssen et al., 1998) than those of wild-caught males (Scott and Vermeirssen, 1995).

In the present work, fish were maintained under a controlled temperature regime and kept under 10 °C for approximately three weeks during the winter. Under these conditions, histological analysis showed that GnRH<sub>a</sub> alone slightly accelerated spermatogenesis and enhanced milt production with respect to controls, while the hydration of the milt was unaffected (Tables 1 and 2). Such stimulatory effect on spermatogenesis by GnRH<sub>a</sub> might be related to the temperature regime employed before the hormonal treatments were administered, or to the fact that in this work the males treated were at an earlier spermatogenic stage than in previous studies (Agulleiro et al., 2006). Further research is needed to clarify this point.

To attempt to enhance the GnRH<sub>a</sub> effect on milt production, GnRH<sub>a</sub> was applied in combination with OA. The OA is an immediate precursor in the biosynthesis of 11-KT through its conversion by the enzyme 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ -HSD), which is present in the testis and other tissues in fish (Mayer et al., 1990a; Schulz and Blüm, 1991). In human, mouse and rat, the reduction of androstenedione to testosterone is catalyzed by 17 $\beta$ -HSD type 3, and it has been recently shown that OA is a substrate not only of zebrafish (*Danio rerio*) but also of human 17 $\beta$ -HSD type 3 (Mindnich et al., 2005). Based on these data, we hypothesized that GnRH<sub>a</sub>+OA administration in Senegalese sole males could result in an additional source of 11-KT, independent of gonadotropin stimulation and hence of regulatory mechanisms at the brain-pituitary level, to potentiate the GnRH<sub>a</sub> effect on spermatogenesis. Consistent with this assumption, males treated with GnRH<sub>a</sub>+OA had a much stronger and sustained increase of 11-KT plasma levels than did males treated with GnRH<sub>a</sub> alone (Fig. 1B). In addition, males treated with GnRH<sub>a</sub>+7 mg kg<sup>-1</sup> OA showed more Lc per cluster and a

higher proportion of Spd per sl in the testis with respect to males treated only with GnRH<sub>a</sub> (Table 1). These data clearly indicated that treatment with GnRH<sub>a</sub>+OA effectively accelerated spermatogenesis with respect to GnRH<sub>a</sub> alone, although it remains to be tested if OA may also stimulate the spermatogenic process by itself. Nevertheless, a very interesting observation was that high doses of OA decreased the amount of milt produced but increased by approximately 2-fold the motility of the Spz (Table 2). These findings indicated that acceleration of spermatogenesis by GnRH<sub>a</sub>+OA was associated with the production of sperm with higher motility. Thus, this situation is somewhat similar to that found in European eel (*Anguilla anguilla*), where sperm motility increases after approximately one month of treatment with human chorionic gonadotropin (Pérez et al., 2000).

The stimulation of spermatogenesis and sperm motility by GnRH<sub>a</sub>+OA treatment might be caused by the enhancement of the production of C<sub>21</sub> steroids that are more likely candidates as 'spermiation-inducing' hormones (Baynes and Scott, 1985; Yueh and Chang, 1997; Thomas, 1999; Vermeirssen et al., 2000; Miura and Miura, 2003). To investigate this scenario, we determined the plasma levels of several C<sub>21</sub> steroids, such as 17,20 $\beta$ P, 17,20 $\alpha$ P and 20 $\beta$ S, that are potentially involved in spermiation in Senegalese sole. However, plasma levels of free 17,20 $\alpha$ P, 20 $\beta$ S, as well as 11-deoxycortisol, were mostly undetectable (<0.2 ng ml<sup>-1</sup>). In agreement with García-López et al. (2006a,b), 17,20 $\beta$ P was measurable in the plasma of male Senegalese sole at levels below 1 ng ml<sup>-1</sup> (although levels in >50% of the males fell below 0.2 ng ml<sup>-1</sup> in the present study). In agreement with the same authors, the levels had no discernible pattern. García-López et al. (2006b) found in F1 specimens that mean levels of 17,20 $\beta$ P were unchanged over the whole course of testis development (i.e. steroid was even detectable in immature fish plasma). On the basis of these joint results, it is fair to question whether what is being detected by the RIA is indeed 17,20 $\beta$ P. It is entirely feasible that label displacement in the RIA at this sort of level could be due to non-specific interfering compounds. This possibility however has yet to be tested.

In contrast to free 17,20 $\beta$ P, plasma concentrations of free+ sulphated 17,20 $\beta$ P and its metabolites were readily detectable, and were more elevated in GnRH<sub>a</sub>+OA treated males than in the other groups during the first two weeks of the experiment (Fig. 2). The elevation of 17,20 $\beta$ P metabolites in plasma in response to GnRH<sub>a</sub> was however low (<2-fold) in comparison to the elevations (>100-fold) in the same 17,20 $\beta$ P metabolites found in plaice and halibut (Vermeirssen et al., 1998, 2004). This disparity can probably be explained by the difference in GSI between the species — the testes of the Senegalese sole being notable for their very small size (0.07% of the total body mass approximately) (García-López et al., 2005, 2006a,b; Table 1). However, concentrations of free+ sulphated 17,20 $\beta$ P and its metabolites had a negative correlation with concentrations of free 17,20 $\beta$ P in the testis (Fig. 3), suggesting, though not proving, that androgens may stimulate conjugation and metabolism of 17,20 $\beta$ P in the testis.

The Senegalese sole represents yet one more species in which, at first appearance, 17,20 $\beta$ P does not appear to be linked to spermiation as, in comparison to many other species, it is

present at relatively low concentrations in the plasma of males (García-López et al., 2006a,b; present work). However, in line with data from other species including the North Sea plaice (Scott et al., 1997; Inbaraj et al., 1997; Vermeirssen et al., 1998), winter flounder (*Pleuronectes americanus*; Canario, 1991), Atlantic halibut (Vermeirssen et al., 2000, 2004) and ayu (*Plecoglossus altivelis*; Suzuki et al., 1981), 17,20 $\beta$ P is almost certainly being made by the testis but is at very low concentrations in plasma because it is rapidly transformed into sulphated or glucuronidated and/or 5 $\beta$ -reduced metabolites. The presence of similar metabolites in Senegalese sole male plasma suggests that 17,20 $\beta$ P might play an important role in the process of spermiation, as previously suggested (García-López et al., 2006a). The question that still remains to be answered is whether the metabolites themselves might have any function. In favor of a role for one or other of the metabolites is the fact that, in male North Sea plaice, 3 $\beta$ -17,20 $\beta$ P-5 $\beta$  is as equipotent with 17,20 $\beta$ P in binding to a putative receptor in the testis and also in stimulating milt hydration (Mugnier et al., 1999).

In conclusion, the present study shows that treatment of Senegalese sole males with GnRHa in combination with OA incremented the circulating levels of 11-KT and of free + sulphated 17,20 $\beta$ P and its metabolites. Most importantly, this treatment accelerated spermatogenesis and markedly increased sperm motility, although the amount of milt produced after twenty eight days of treatment was reduced. Thus, although additional studies are needed to identify the mechanism of action of sex steroids in Senegalese sole testis, the present study suggests that GnRHa+OA might be employed as a potential hormonal therapy to ameliorate reproductive dysfunctions of captive Senegalese sole males.

## Acknowledgements

We thank J. Canoura for his assistance during fish maintenance. This work was supported by grants from the “Junta Asesora de Cultivos Marinos” (JACUMAR) of the Spanish Ministry for Agriculture and Fisheries (Spain), and from the Reference Center of Aquaculture, Generalitat de Catalunya (Spain) to J.C. M.J.A. was recipient of a fellowship from the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Spain).

## References

- Agulleiro, M.J., Anguis, V., Cañavate, J.P., Martínez-Rodríguez, G., Mylonas, C.C., Cerdà, J., 2006. Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. *Aquaculture* 257, 511–524.
- Anguis, V., Cañavate, J.P., 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243, 133–145.
- Baynes, S.M., Scott, A.P., 1985. Seasonal variations of parameters of milt production and in plasma concentration of sex steroids of male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 57, 150–160.
- Berlinsky, D.L., King, W.V., Smith, T.I.J., Hamilton II, R.D., Holloway Jr., J., Sullivan, C.V., 1996. Induced ovulation of Southern flounder *Paralichthys lethostigma* using gonadotropin releasing hormone analogue implants. *J. World Aquac. Soc.* 27, 143–152.
- Berlinsky, D.L., William, K., Hodson, R.G., Sullivan, C.V., 1997. Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus*. *J. World Aquac. Soc.* 28, 79–86.
- Borg, B., 1994. Androgens in teleosts fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109C, 219–245.
- Borg, B., Antonopoulou, E., Anderson, E., Carlberg, T., Mayer, I., 1993. Effectiveness of several androgens in stimulating kidney hypertrophy, a secondary sexual character, in castrated male three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Can. J. Zool.* 71, 2327–2329.
- Cabrita, E., Soares, F., Dinis, M.T., 2006. Characterization of Senegal sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. *Aquaculture* 261, 967–975.
- Canario, A.V.M., 1991. Sex steroids in marine flatfish. In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. (Eds.), *Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. FishSymp 91*, Sheffield, United Kingdom, pp. 71–73.
- Canario, A.V.M., Scott, A.P., 1991. Levels of 17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -pregnane, and other sex steroids, in blood plasma of male dab, *Limanda limanda* (marine flatfish) injected with human chorionic gonadotrophin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83, 258–264.
- Carolsfeld, J., Scott, A.P., Collins, P.M., Sherwood, N.M., 1996. Reproductive steroids during maturation in a primitive teleost, the Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 103, 331–348.
- Clearwater, S.J., Crim, L.W., 1998. Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 349–357.
- Cobb, G.W., 1998. *Introduction to Design and Analysis of Experiments*. Springer-Verlag, New York.
- García-López, A., Martínez-Rodríguez, G., Sarasquete, C., 2005. Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): anatomy, histology and histochemistry. *Histol. Histopathol.* 20, 1179–1189.
- García-López, A., Anguis, V., Couto, E., Canario, A.V.M., Cañavate, J.P., Sarasquete, C., Martínez-Rodríguez, G., 2006a. Non-invasive assessment of reproductive status and cycle of sex steroid levels in a captive wild broodstock of Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup). *Aquaculture* 254, 583–593.
- García-López, A., Fernández-Pasquier, V., Couto, E., Canario, A.V.M., Sarasquete, C., Martínez-Rodríguez, G., 2006b. Testicular development and plasma sex steroid levels in cultured male Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 343–351.
- Goos, H.J.Th., Consten, D., 2002. Stress adaptation, cortisol and pubertal development in the male common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 197, 105–116.
- Harmin, S.A., Crim, L.W., 1993. Influence of gonadotropic hormone releasing hormone analog (GnRH-A) on plasma sex steroids profiles and milt production in male winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Fish Physiol. Biochem.* 10, 399–407.
- Holdcraft, R.W., Braun, R.E., 2004. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int. J. Androl.* 27, 335–342.
- Inbaraj, R.M., Scott, A.P., Vermeirssen, E.L.M., 1997. Use of a radioimmunoassay which detects C21 steroids with a 5 $\beta$ -reduced, 3 $\alpha$ -hydroxylated configuration to identify and measure steroids involved in final oocyte maturation in female plaice (*Pleuronectes platessa*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 105, 50–61.
- Lim, H.K., Pankhurst, N.W., Fitzgibbon, Q.P., 2004. Effects of slow release gonadotropin releasing hormone analog on milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder, *Rhombosolea tapirina*. *Aquaculture* 240, 505–516.
- Martin-Robichaud, D.J., Powell, J., Wade, J., 2000. Gonadotropin-releasing hormone affects sperm production of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Bull. - Aquac. Assoc. Can.* 4, 45–48.
- Mayer, I., Borg, B., Schulz, R., 1990a. Conversion of 11-ketoandrostenedione to 11-ketotestosterone by blood cells of six fish species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77, 70–74.
- Mayer, I., Borg, B., Schulz, R., 1990b. Seasonal changes in and effect of castration/androgen replacement on the plasma levels of five androgens in the male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 23–30.

- Mindnich, R., Haller, F., Halbach, F., Moeller, G., Hrabé de Angelis, M., Adamski, J., 2005. Androgen metabolism via 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 in mammalian and non-mammalian vertebrates: comparison of the human and the zebrafish enzyme. *J. Mol. Endocrinol.* 35, 305–316.
- Miura, T., Miura, C., 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 181–186.
- Moon, S.H., Lim, H.K., Kwon, J.Y., Lee, J.K., Chang, Y.J., 2003. Increased plasma 17-hydroxyprogesterone and milt production in response to gonadotropin-releasing hormone agonist in captive male starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Aquaculture* 218, 703–716.
- Mugnier, C., Scott, A.P., Vermeirssen, E.L.M., Rand-Weaver, M., 1999. Two pathways of C21 steroid biosynthesis in North Sea plaice *Pleuronectes platessa*: what controls them and what is their function? In: Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E., Stefansson, S.O. (Eds.), *Proceedings of the 6th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, Bergen, Bergen 2000, Norway, pp. 173–175.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10, 463–491.
- Nagahama, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38, 217–229.
- Pankhurst, N.W., Poortenaar, C.W., 2000. Milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder *Rhombosolea tapirina* following treatment with exogenous hormones. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* 33, 141–159.
- Pérez, L., Aturiano, J.F., Tomás, A., Zegrari, S., Barrera, R., Espinós, F.J., Navarro, J.C., Jover, M., 2000. Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. *J. Fish Biol.* 57, 1488–1504.
- Petersen, C., Soder, O., 2006. The sertoli cell — a hormonal target and ‘super’ nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm. Res.* 66, 153–161.
- Rodríguez, L., Begtashi, I., Zanuy, S., Carrillo, M., 2000. Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at puberty. *Fish Physiol. Biochem.* 23, 141–150.
- Schulz, R.W., Blüm, V., 1991. Extragonadal 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 82, 197–205.
- Scott, A.P., Sorensen, P.W., 1994. Time course of release of pheromonally active gonadal steroids and their conjugates by ovulatory goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96, 309–323.
- Scott, A.P., Vermeirssen, E.L.M., 1995. Research on reproductive priming pheromones in fish. In: Canario, A.V.M., Power, D.M. (Compilers), *Proceedings of Workshop Fish Pheromones: Origins and Modes of Action*, University of Algarve, Faro, Portugal, pp. 15–23.
- Scott, A.P., MacKenzie, D.S., Stacey, N.E., 1984. Endocrine changes during natural spawning of the white sucker *Catostomus commersoni*. II. Steroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56, 349–359.
- Scott, A.P., Sherwood, N.M., Canario, A.V.M., Warby, C.M., 1991. Identification of free and conjugated steroids, including cortisol and 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, in the milt of Pacific herring, *Clupea harengus pallasii*. *Can. J. Zool.* 69, 104–110.
- Scott, A.P., Inbaraj, R.M., Vermeirssen, E.L.M., 1997. Use of a radioimmunoassay which detects C21 steroids with a 17, 20 $\beta$ -dihydroxyl configuration to identify and measure steroids involved in final oocyte maturation in female plaice (*Pleuronectes platessa*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 105, 62–70.
- Suzuki, K., Tamaoki, B.-I., Hirose, K., 1981. In vitro metabolism of 4-pregnenes in ovaries of a freshwater teleost, the ayu (*Plecoglossus altivelis*): production of 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one and its 5 $\beta$ -reduced metabolites, and activation of 3 $\beta$ - and 20 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases by treatment with a fish gonadotropin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 45, 473–481.
- Thomas, P., 1999. Nuclear and membrane steroid receptors and their functions in teleost gonads. In: Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E., Stefansson, S.O. (Eds.), *Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, Bergen 2000, Bergen, Norway, pp. 149–156.
- Trant, J.M., Thomas, P., 1989. Isolation of a novel maturation-inducing steroid produced in vitro by ovaries of Atlantic croaker. *Gen. Comp. Endocrinol.* 75, 397–404.
- Tvedt, H.B., Benfey, T.J., Martin-Robichaud, D.J., Power, J., 2001. The relationship between sperm density, spermatocrit, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Aquaculture* 194, 191–200.
- Vermeirssen, E.L.M., Scott, A.P., Mylonas, C.C., Zohar, Y., 1998. Gonadotropin-releasing hormone agonist stimulates milt fluidity and plasma concentrations of 17,20 $\beta$ -dihydroxylated and 5 $\beta$ -reduced, 3 $\alpha$ -hydroxylated C21 steroids in male plaice (*Pleuronectes platessa*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 112, 163–177.
- Vermeirssen, E.L.M., Shields, R., Mazorra de Quero, C., Scott, A.P., 2000. Gonadotropin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiol. Biochem.* 22, 77–87.
- Vermeirssen, E.L.M., Mazorra de Quero, C., Shields, R.J., Norberg, B., Kime, D.E., Scott, A.P., 2004. Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotropin-releasing hormone agonist implant. *Aquaculture* 230, 547–567.
- Yueh, W.S., Chang, C.F., 1997. 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one and 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one stimulated spermiation in protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *Fish Physiol. Biochem.* 17, 187–193.

# Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist

Maria J. Agulleiro<sup>a,c</sup>, Victoria Anguis<sup>d</sup>, José Pedro Cañavate<sup>d</sup>, Gonzalo Martínez-Rodríguez<sup>e</sup>, Constantinos C. Mylonas<sup>f</sup>, Joan Cerdà<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Center of Aquaculture-IRTA, 43540-Sant Carles de la Ràpita, Tarragona, Spain

<sup>b</sup> Lab IRTA-ICM, CMIMA (CSIC), Passeig Marítim 37-49, 08003-Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Reference Center in Aquaculture, Generalitat de Catalunya, Spain

<sup>d</sup> Centro de Investigación y Formación Pesquera y Acuicola (CIFPA) “El Toruño”, Junta de Andalucía, Apartado 16, 11500 Puerto de Santa María, Cádiz, Spain

<sup>e</sup> Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC), Apartado Oficial, Puerto Real, Cádiz 11510, Spain

<sup>f</sup> Institute of Aquaculture, Hellenic Center for Marine Research, P.O. Box 2214, Heraklion 71003, Crete, Greece

Received 9 September 2005; received in revised form 17 December 2005; accepted 2 February 2006

## Abstract

Captive-reared Senegal sole were treated with intramuscular injection or sustained-release implants of gonadotropin-releasing hormone agonist [D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>, NEt] GnRH<sub>a</sub> (GnRH<sub>a</sub>) to induce spermiation and spawning. Fish were treated with GnRH<sub>a</sub> during spring (April–May) or autumn (October), the natural spawning seasons known to occur in wild Senegal sole. During spring, females injected with a dose of 5 µg GnRH<sub>a</sub> kg<sup>-1</sup> three times a week, or treated with a single GnRH<sub>a</sub>-loaded implant (50 µg kg<sup>-1</sup>) showed multiple ovulations and spawns within a period of approximately 30 days. Plasma levels of 17β-estradiol (E2) were elevated at 7 days post-treatment, preceding the spawns with the highest fecundity, concomitant with a decrease in the levels of plasma testosterone (T). During autumn, however, females changed their responsiveness to GnRH<sub>a</sub> treatment, a dose of 5 µg kg<sup>-1</sup> being ineffective in inducing spawning, while a dose of 1 µg kg<sup>-1</sup> induced a few spawns. Accordingly, plasma E2 levels showed a small increase after injection of 1 µg kg<sup>-1</sup> GnRH<sub>a</sub>. In contrast to females, GnRH<sub>a</sub> injection or implantation in males was ineffective in enhancing spermiation or milt production, regardless of the season when the treatments were applied. However, GnRH<sub>a</sub> treatment in males increased plasma levels of T and 11-ketotestosterone (11-KT) during spring, while in autumn the levels of plasma androgens decreased after GnRH<sub>a</sub> injection. These results show that administration of GnRH<sub>a</sub> during spring either by injection or sustained-release implants induces multiple spawns in captive Senegal sole, although these treatments were ineffective in inducing or enhancing sperm production in males.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** GnRH<sub>a</sub>; Sexual steroids; Spawning; Sperm; Implant

## 1. Introduction

During the last decades, marine fish aquaculture in Southern Europe has been mostly concentrated on

\* Corresponding author. IRTA Lab, Room B46, CMIMA-CSIC, Passeig Marítim, 37-49, 08003-Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 230 95 31; fax: +34 93 230 95 55.

E-mail address: [joerca@icm.csic.es](mailto:joerca@icm.csic.es) (J. Cerdà).



gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). As a result, market saturation with a concomitant drop in price has occurred, necessitating further scientific and technological efforts for the development of culture technologies for new potential species. Among the most promising candidates are Soleid flatfishes provided that effective culture methods and strategies for increasing market opportunities can be developed.

On-growing methods for sole, which include both the common sole (*Solea solea*) and Senegal sole (*Solea senegalensis*), have improved in the last two decades (Howell, 1997; Dinis et al., 1999; Rueda-Jasso et al., 2004). Studies have shown that Senegal sole may have a better growth in captivity than common sole (Olmedo et al., 2003; Rodríguez and Souto, 2003) and, consequently, may be better suited for commercialisation. Natural spawns of viable eggs have been obtained from wild Senegal sole acclimatized to captivity, and optimized weaning methods for the larvae are currently being developed (Dinis, 1986, 1992; Vázquez et al., 1994; Cañavate and Fernandez-Díaz, 1999; Aragão et al., 2004a,b; Morais et al., 2005; Anguis and Cañavate, 2005). Therefore, Senegal sole is currently an important focus of research for flatfish aquaculture in Europe, particularly in Spain and Portugal. However, before a reliable technology for mass production of Senegal sole can be transferred to the industry, several aspects of its culture still need to be solved and optimized.

The culture technology for Senegal sole is mainly impaired by the lack of methods to control reproduction in captivity, especially in the first generation (F1) of reared broodstock. The natural spawning season in the Mediterranean occurs in spring (from March until June), with some occasional spawning during autumn and winter (Arias and Drake, 1990; Cabral and Costa, 1999; Cabral, 2000). This pattern of spawning is also observed in wild Senegal sole in captivity under natural temperature regimes (Dinis et al., 1999; Anguis and Cañavate, 2005). However, natural spawning of wild-caught fish require long periods of adaptation to captive conditions, and when they do occur they are often unpredictable and the quality of the eggs produced is variable. Naturally fluctuating temperature regimes, within the range between 17 and 20 °C, may enhance spawning activity (Anguis and Cañavate, 2005), although information on the specific water temperature protocols that affect gonad maturation and spawning are still lacking. In fish reared under intensive culture conditions (F1 generation), the situation is generally more complicated since during the spawning period females undergo vitellogenesis and final oocyte maturation (FOM), but very often they fail to spawn. In

some cases, however, spontaneous spawnings of F1 fish in captivity have been reported (Cañavate et al., 2005).

The application of hormonal therapies, mostly based on the administration of gonadotropin-releasing hormone agonists (GnRHa), which trigger the release of pituitary gonadotropins, are common strategies to ameliorate reproductive dysfunctions of cultured fish (Crim and Bettles, 1997; Mylonas and Zohar, 2001; Zohar and Mylonas, 2001). In most cases, these methods are efficient in inducing FOM, ovulation and spawning of teleosts that normally do not reproduce in captivity. In addition, they are also able to synchronize ovulation or spawning in order to optimize egg collection and fry production in those species that do mature spontaneously in captivity (e.g., salmonids). In flatfish, GnRHa treatments are able to promote ovulation and spawning of females (Ramos, 1986a,b; Harmin and Crim, 1992; Scott et al., 1999; Mugnier et al., 2000), although in plaice (*Pleuronectes platessa*), Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), and summer (*Paralichthys dentatus*) and Southern flounder (*P. lethostigma*), administration of GnRHa in males has only a weak effect, at best, in inducing or enhancing sperm production (Berlinsky et al., 1996, 1997; Vermeirssen et al., 1998, 2000; Tvedt et al., 2001).

In Senegal sole, preliminary attempts to induce spawning through GnRHa treatment were not effective or resulted in the production of poor quality eggs (Dinis, 1986). In the present work, we describe a series of trials performed during three consecutive years aimed at investigating the effectiveness of different GnRHa administration methods, i.e., intramuscular injection or GnRHa sustained-release implants, in inducing ovulation and spermiation. The changes in plasma levels of sexual steroids in response to the different GnRHa treatments, in both males and females, were also determined.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Broodstock management

Adult Senegal sole, F1 generation (approximately 1–2 years old), were reared from eggs spawned by different stocks of wild fish acclimated to captivity at the facilities of the CIFPA “El Toruño” (Puerto de Santa María, Cádiz, Spain). Selected fish were transported to the Center of Aquaculture-IRTA and were maintained for approximately 1 year before starting the experiments. During the adaptation period, fish were fed ad libitum once a day with commercial pellets (Proaqua, Spain), and kept under natural photoperiod and temperature in 12,000-l rectangular tanks. Starting approximately



3 months before the experiments, fish were fed ad libitum with a practical diet composed of 44% broodstock feed (Proaqua, Spain), 22% fresh squid, 22% fresh mussels, 11% oil mixture for broodstock feeds (Incro-mega, Croda, Spain), and 1.3% of a vitamin mix (Nutreco). For the experiments using wild Senegal sole, fish were obtained from coastal ponds in the Bay of Cádiz (Spain) and adapted and maintained in captivity at the facilities of the CIFPA “El Toruño” as previously described (Anguis and Cañavate, 2005).

Fish were sexed and tagged to allow later monitoring. Because acquisition of ovarian biopsies through intra-ovarian cannulation in Senegal sole is often very difficult and stressful to the fish, in some cases the stage of gonad development of females was determined by the estimation of abdominal swelling as described by Anguis and Cañavate (2005). In this classification, stage 0 corresponds to externally undetectable gonads, stage I when the ovary can be detected by touching the ventral area of the female, stages II and III when different degrees of gonad swelling is visible externally (initial and intermediate, respectively), and stage IV when maximum ovarian swelling is observed as a result of oocyte hydration during FOM. Males were identified by feeling for the shape of the testis with gentle pressure on the abdomen and by checking for the production of small amounts of milt. In fish where the presence of ovary or testis could not be distinguished, females were identified by the detection of plasma vitellogenin by Western blot using a commercial monoclonal antibody against killifish (*Fundulus heteroclitus*) vitellogenin (ND-5F8; Biosense), which shows cross-reactivity with Senegal sole vitellogenin (data not shown).

## 2.2. Experimental protocols for GnRHa treatment

From 2002 to 2004, fish maintained under natural photoperiod and temperature were selected before the two annual spawning periods, spring (April–May) and autumn (October). During each year, different experiments were carried out to test the effectiveness of different GnRHa administration methods. The GnRHa analogue used was [D-Ala<sup>6</sup>, Pro<sup>9</sup>, NEt] GnRHa (Bachem Bioscience, King of Prussia, PA). In all the trials, fish were placed in 1500l circular tanks (stocking density 0.6–0.8 kg m<sup>-2</sup>) connected to a recirculated water system for the control of temperature, and hormonal treatments were given in duplicate tanks (3–5 males and females in each tank). The photoperiod was maintained at 13L:11D, and the female:male sex ratio in each tank was approximately 1:1. Throughout the experiments, fish were fed with the diet described above.

### 2.2.1. Intramuscular injection of GnRHa

In spring 2002, a preliminary trial was performed, in which 1-year-old F1 fish (0.7–0.8 kg in weight) were injected intramuscularly with GnRHa dissolved in 0.6% NaCl at doses of 1, 5 or 30 µg kg<sup>-1</sup> body weight (BW) under a natural temperature regime. Control fish were treated with 0.6% NaCl.

Subsequent trials were performed during 2003 using older broodfish (1.2–1.3 kg in weight), in which the effect of GnRHa treatment during spring or autumn was investigated. For these experiments, females at stages II–III of ovarian development, and both spermiating and non-spermiating males were selected. During spring, fish were injected once a week or every 3 days (3 d) with a dose of 5 µg GnRHa kg<sup>-1</sup> for 30 days, while the temperature in the tanks was maintained under weekly fluctuations from 16 to 21 °C, to potentially enhance spawning performance (Anguis and Cañavate, 2005). In autumn, wild fish adapted to captivity for 2 years were injected once a week with 1 or 5 µg GnRHa kg<sup>-1</sup> for 30 days, and the temperature of the water was controlled to induce a fluctuation from 18 to 21 °C during the treatment period. In both experiments, control fish were injected with saline.

### 2.2.2. GnRHa implants

During spring 2004, experiments aimed at comparing the effectiveness of a sustained-delivery GnRHa implant and repeated GnRHa injections, in inducing spawning of F1 broodstock. Before GnRHa treatment, a random sample of males and females ( $n=4$ ) from the broodfish stock was sacrificed by stunning and decapitation, and the gonadosomatic index (GSI%, gonad weight/body weight) recorded. Pieces of gonads were also fixed in McDowell's and Trump's 4F:1G fixative (McDowell and Trump, 1976) for histological examination. The males (0.8–0.9 kg in weight) selected for the hormonal treatments showed signs of spermiation, while the females (1.0–1.2 kg in weight) showed stage I-II of ovarian development and a GSI of 6.7–11.3 (Fig. 1). The histological analysis of the ovaries of the four females indicated the presence of oocytes at various developmental stages, such as previtellogenic, early vitellogenic and vitellogenic, while oocytes undergoing FOM were not detected (Fig. 1a). Fully grown vitellogenic oocytes showed the germinal vesicle still occupying a central position. In some females, the ovary also contained oocytes undergoing atresia with a low frequency (Fig. 1b and c). The testis of the sampled males showed fully developed seminiferous tubules containing all the different spermatogenic cell types, including spermatozoa (not shown).

Males and females were injected weekly with 5 µg GnRHa kg<sup>-1</sup>, or treated with a single GnRHa-loaded

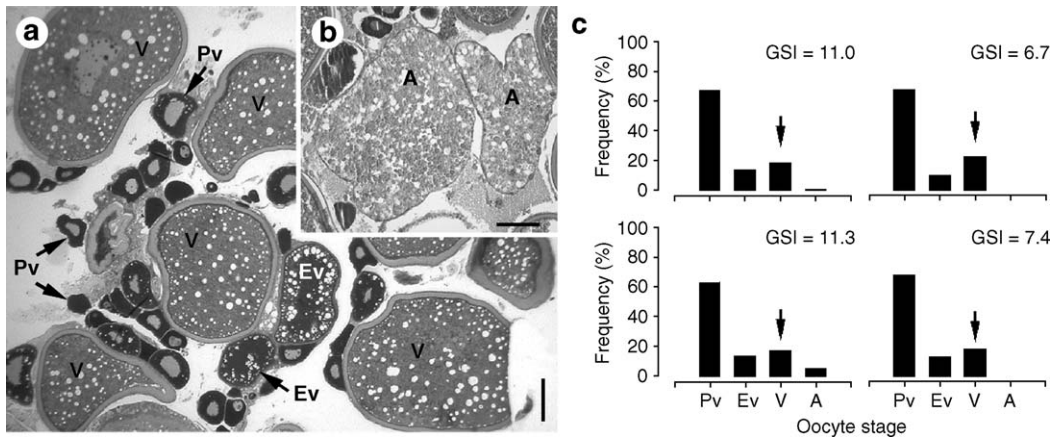


Fig. 1. Ovarian development of Senegal sole F1 females. (a) Representative photomicrographs of ovarian histological sections from females during spring before hormonal treatment. Previtellogenic oocytes (Pv), early vitellogenic oocytes (Ev), vitellogenic oocytes (V). Scale bar 200  $\mu$ m. (b) Oocytes undergoing atresia (A). Scale bar 100  $\mu$ m. (c) Ovarian profiles of Pv, Ev, V and A oocytes in the ovary of four different females before hormonal treatment. The frequency of Pv, Ev, V, and A oocytes were expressed as percentages calculated from at least 3 different histological sections from the same ovary per female. The arrows in each panel indicate V oocytes.

Ethylene-Vinyl Acetate (EVAc) implant (Mylonas and Zohar, 2001), and spawnings were monitored for a period of 20 days. The GnRHa cylindrical pellets (2 mm in diameter and 3 mm in length) were inserted underneath the skin in the dorsal musculature by means of a special implanter syringe, and were given at doses of 5, 25 or 50  $\mu$ g  $\text{kg}^{-1}$ . Control fish were treated with a control implant, containing no GnRHa. In this experiment, the temperature was maintained at 19–20  $^{\circ}\text{C}$ , since either short or long temperature fluctuations did not show any effect on GnRHa-induced spawning in the 2002–3 experiments (see Results). At the end of the GnRHa treatments, males and females from each experimental group were sacrificed ( $n=3-4$ ), the GSI recorded, and pieces of the gonads fixed for histological examination.

### 2.3. Steroid analysis

Before hormonal treatments were given, and once a week thereafter, fish were sedated with 100 ppm phenoxyethanol and approximately 0.5 ml of blood was extracted from the caudal vein with a heparinized syringe, centrifuged, and the plasma stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. In 2004, blood samples were taken before and 20 days after GnRHa administration. Plasma levels of free 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>; measured only in females), testosterone (T) and 11-ketotestosterone (11-KT; measured only in males) were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) following the method described by Rodríguez et al. (2000). Free steroids were extracted from 3.5  $\mu$ l plasma in 1 ml methanol. Standards for E<sub>2</sub>, T and 11-KT, specific rabbit antibodies against

these steroids, mouse anti-rabbit IgG monoclonal antibody and enzymatic tracers (steroid acetylcholinesterase conjugate: E<sub>2</sub>-AChE, T-AChE, and 11-KT-AChE) were obtained from Cayman Chemical Company (Michigan, USA). Microtiter plates (MaxiSorp™) were purchased from Nalgen Nunc Internacional (Rochester, USA). A standard curve from  $6.1 \times 10^{-4}$  to 2.5 ng  $\text{ml}^{-1}$  was established in all the assays. Standards and extracted plasma samples were run in duplicate. The lower limits of detection (80% of binding, ED<sub>80</sub>) were  $1.7 \pm 2.1$  pg  $\text{ml}^{-1}$  for E<sub>2</sub> ( $n=11$ ),  $1.5 \pm 0.2$  pg  $\text{ml}^{-1}$  for T ( $n=17$ ), and  $0.9 \pm 0.2$  pg  $\text{ml}^{-1}$  for 11-KT ( $n=8$ ). The inter-assay coefficients of variation at 50% of binding were 28.7% for E<sub>2</sub> ( $n=11$ ), 6.3% for T ( $n=17$ ), and 4.1% for 11-KT ( $n=8$ ). The intra-assay coefficients of variation (calculated from the samples duplicates) were  $4.6 \pm 0.7\%$  for E<sub>2</sub> ( $n=11$ ),  $3.1 \pm 0.3\%$  for T ( $n=17$ ), and  $5.7 \pm 0.7\%$  for 11-KT ( $n=8$ ). The highest levels of cross-reactivity of the antibodies employed were: anti-E<sub>2</sub>, 4% with estrone; anti-T, 3.7% with androstenedione; and anti-11-KT, 0.01% with 4-androsten-11 $\beta$ -17b-diol-3-one (as given by the supplier).

### 2.4. Egg collection and evaluation of gamete quality

Eggs were collected three times a day using net collectors located at the outflow of the tanks. Buoyant eggs were separated from non-buoyant eggs, as a measure of egg quality, in a calibrated cylinder for about 1 h. The eggs were immediately incubated in different tanks at 19  $^{\circ}\text{C}$  for determination of hatching success. Fertilisation was assessed in a fraction of 100 buoyant eggs under a

stereomicroscope. Fecundity was expressed as total egg production or relative fecundity (eggs kg<sup>-1</sup> female).

During the GnRH<sub>a</sub> injection trials, spermiating males were identified by the release of sperm after application of gentle abdominal pressure approximately every week. When milt could be obtained, and was free of urine, the total volume of sperm was recorded by using a micropipette. Sperm density (SD) was determined in 1:100 or 1:200 diluted sperm using a haemocytometer and a Leica DMLB light microscope. Also when sperm was obtained clean, the spermatocrit (Sct) was determined using a capillary pipette that was centrifuged at 13,000 rpm for 10 min. To measure sperm motility, milt samples were diluted 100-fold in filtered seawater being rapidly placed on microscope slides and immediately viewed at ×200 magnification under the microscope. The sperm motility duration (SMD) was defined as the time from the beginning of activation to the cessation of all spermatozoa movement (Lim et al., 2004).

### 2.5. Histological analysis

The fixed gonad was embedded in glycol methacrylate resin (Technovit 7100, Heraeus Kultzer, Germany), sectioned at 3 μm and stained with methylene blue/azure II/basic fuchsin (Bennett et al., 1976). In ovaries, the stage-frequency profiles of ovarian follicles were made on histological sections by using a light microscope. The presence of pre-vitellogenic, early vitellogenic, vitellogenic, and atretic oocytes (Fig. 1a) was expressed as

percentage ( $n=100-150$  follicles) from at least 3 different histological sections from the same ovary per female.

In the GnRH<sub>a</sub> implantation experiments, the testis spermatozoa index (TSI) was calculated as an estimation of the amount of spermatozoa produced. The TSI was determined by microscopic examination of at least three different histological sections of each male at the end of the experimental period. The number of spermatozoa was scored in at least 3 different seminiferous tubules in each section, and the mean number of spermatozoa per tubule was calculated.

### 2.6. Statistics

Data were expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.). The data were statistically analyzed by one- or two-factor analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's means comparison test. When necessary, and especially for the plasma steroid levels that showed high variations, data were log-transformed to obtain homogeneous variances. The level of significance for all tests was set at  $P<0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Induction of spawning by injection of GnRH<sub>a</sub>

One-year-old Senegal sole males and females (F1 generation) were initially stimulated by injection of GnRH<sub>a</sub> during the spring of 2002 (Table 1). Control fish

Table 1  
Effect of injection of GnRH<sub>a</sub> on the spawning performance of F1 and wild Senegal sole females during spring and autumn

Treatment (μg GnRH <sub>a</sub> kg <sup>-1</sup> )	<i>n</i>	Mean weight (kg)	Spawnings ( <i>n</i> )	Total eggs	Relative fecundity (eggs kg <sup>-1</sup> )	Egg buoyancy <sup>a</sup> (%)
2002 (F1, spring)						
Saline (1)	6	0.8±0.05	0	–	–	–
1 (1)	3	0.7±0.07	2	55,000	25,688	36.1
5 (1)	3	0.7±0.02	5	165,000	65,476	48.7±14.1 <sup>ab</sup>
30 (1)	3	0.8±0.02	0	–	–	–
2003 (F1, spring)						
Saline (w)	8	1.3±0.09	0	–	–	–
5 (w)	9	1.3±0.06	21	1,756,500	151,684	43.7±1.3 <sup>b</sup>
5 (3d)	9	1.2±0.06	34	2,869,500	256,228	53.7±0.8 <sup>a</sup>
2003 (wild, autumn)						
Saline (w)	6	1.6±0.1	0	–	–	–
1 (w)	6	1.9±0.2	14	399,000	35,820	29.1±4.0 <sup>c</sup>
5 (w)	6	1.9±0.2	5	80,000	7,148	4.2±1.4 <sup>d</sup>

When indicated data are the mean ± S.E.M. As indicated for each year, GnRH<sub>a</sub> was delivered once (1), weekly (w) or every 3 days (3d). The treatments were given in duplicate for a period of 30 days. The data from duplicates are pooled together (for egg production, the summatory of daily egg production of both tanks is indicated).

<sup>a</sup> The value was calculated from the percentage of buoyant eggs of each spawning. Different superscripts indicate significant differences (ANOVA,  $P<0.05$ ) among values within the same column.

did not show any spontaneous spawning. In contrast, injection with 1 or 5 µg GnRH<sub>a</sub> kg<sup>-1</sup> induced spawning 3–4 days after the treatment, while the dose of 30 µg GnRH<sub>a</sub> kg<sup>-1</sup> was not effective. Females injected with 1 µg GnRH<sub>a</sub> kg<sup>-1</sup> produced 55,000 eggs with a relative fecundity of 25,688 eggs kg<sup>-1</sup>, whereas the dose of 5 µg GnRH<sub>a</sub> kg<sup>-1</sup> induced more ovulations per female with a total production of 165,000 eggs and a relative fecundity of 65,476 eggs kg<sup>-1</sup>. In both cases, the percentage of buoyant eggs was similar (36.1% and 48.7±14.1%). However, none of the eggs produced were fertilised.

Subsequent trials were carried out during 2003 on older F1 broodfish, which were injected once a week or every 3 d with 5 µg GnRH<sub>a</sub> kg<sup>-1</sup> for 30 days. These treatments resulted in an increased number of spawns per female with respect to that observed in the preliminary trial, the number of spawns being higher in females

injected with GnRH<sub>a</sub> every 3 d (34 spawns) than in those treated only weekly (21 spawns), while control fish did not spawn (Table 1 and Fig. 2). Egg production of females treated once a week with GnRH<sub>a</sub> was enhanced at approximately 3 d post-injection. Both the number of eggs and relative fecundity after GnRH<sub>a</sub> treatments were higher with respect to the preliminary trial, and these increased according with the number of GnRH<sub>a</sub> injections applied. Thus, 1,756,000 eggs and 151,684 eggs kg<sup>-1</sup>; and 2,869,000 eggs and 256,228 eggs kg<sup>-1</sup>, were obtained from females injected weekly or every 3 d, respectively (Table 1). However, although the percentage of buoyant eggs was similar between treatments (43.7±1.3% and 53.7±0.8%) and to that observed in younger fish, the eggs produced were again not fertilised.

The effect of injection of GnRH<sub>a</sub> was finally tested during the second annual spawning period that occurs in

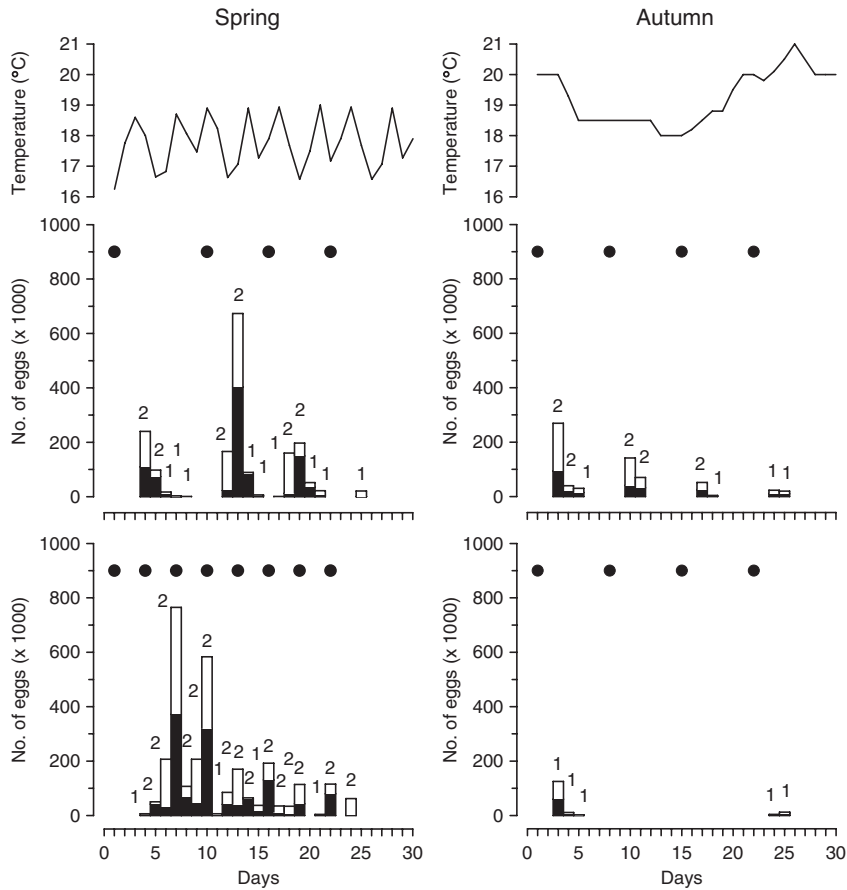


Fig. 2. Daily egg production of Senegal sole females ( $n=6-9$  per treatment) selected in spring or autumn injected with GnRH<sub>a</sub> under controlled temperature. During spring, females were injected with 5 µg GnRH<sub>a</sub> kg<sup>-1</sup> once a week or every 3 d (upper and lower panel, respectively). In autumn, fish were injected once a week with 1 µg or 5 µg GnRH<sub>a</sub> kg<sup>-1</sup> BW (upper and lower panel, respectively). Data shown are cumulative of the spawn recorded in each of two replicate tanks. In each panel, the dots indicate the days of injection, and the numbers on top of each bar indicate the number of daily spawns observed. Control fish injected with saline did not spawn (not shown). Black bars indicate the amount of sinking eggs, whereas white bars indicate the amount of buoyant eggs.

Table 2

Effects of weekly GnRH<sub>a</sub> injection for a month during autumn on sperm production and quality of wild Senegal sole males

Treatment ( $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$ )	<i>n</i>	Mean weight (kg)	Spermiating males ( <i>n</i> )	Sperm volume ( $\mu\text{l}$ )	Sct <sup>1</sup> (%)	SD <sup>2</sup> ( $\times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ )	SMD <sup>3</sup> (s)
Saline	6	1.4 $\pm$ 0.1	5	34 $\pm$ 6	15.4 $\pm$ 4.7	2.0 $\pm$ 1.0	60 $\pm$ 20
1	6	1.2 $\pm$ 0.1	5	30 $\pm$ 5	22.2 $\pm$ 7.2	3.1 $\pm$ 1.0	132 $\pm$ 49
5	6	1.3 $\pm$ 0.3	5	27 $\pm$ 6	13.2 $\pm$ 4.8	2.6 $\pm$ 1.0	96 $\pm$ 50

<sup>1</sup>Sct, spermatoctrit; <sup>2</sup>SD, sperm density; <sup>3</sup>SMD, spermatozoa motility duration. These parameters did not significantly change during the weekly samplings, and thus the mean $\pm$ S.E.M. of all samplings points is indicated.

Other details as in Table 1.

autumn using wild fish adapted to captivity. Males and females were injected once a week with 1 or 5  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  for approximately one month (Table 1). During the first 2 weeks, the temperature in the tanks progressively decreased from 20 to 18 °C, to increase up to 21 °C during the last 2 weeks (Fig. 2). As observed in previous experiments, saline-injected fish did not spawn. Injection with GnRH<sub>a</sub> was effective in inducing spawning, but the response of females to increasing

doses of GnRH<sub>a</sub> was different to that observed in the spring. During autumn, injection with 1  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  induced 14 spawns in total, while injection of 5  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$ , previously observed to be highly effective, induced only 5 spawns (Table 1 and Fig. 2). Accordingly, the number of eggs produced and relative fecundity were lower than those obtained during spring (Table 1). The quality of the eggs produced with a dose of 5  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  was significantly ( $P < 0.05$ ) lower

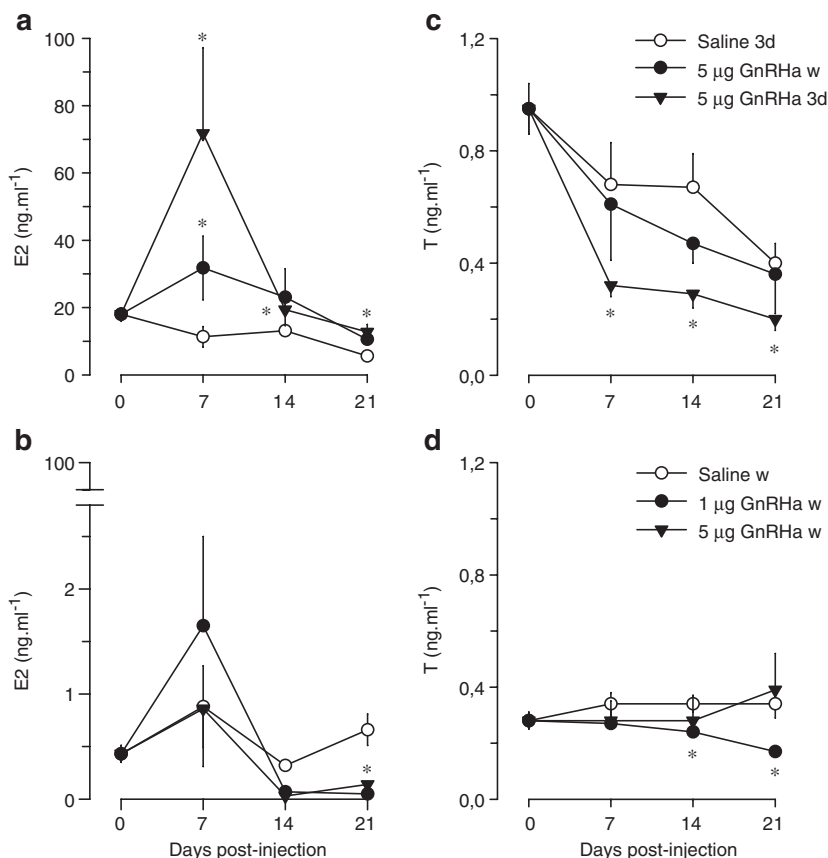


Fig. 3. Changes in plasma levels of 17 $\beta$ -estradiol (E2) and testosterone (T) in females injected with GnRH<sub>a</sub> during spring (a and c) and autumn (b and d). In spring, fish were injected with 5  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  weekly (w) or every 3 d, and control fish were injected every 3 d with saline. In autumn, the fish were injected with saline or with 1 or 5  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  w. Data are the mean $\pm$ S.E.M. ( $n = 5-6$  females). The asterisks denote significant differences with respect to the control values (ANOVA,  $P < 0.05$ ).



than that observed with 1  $\mu\text{g}$  GnRHa, but in both cases egg buoyancy was significantly ( $P < 0.05$ ) lower than that obtained during spring (Table 1).

In males examined in autumn, saline- and GnRHa-treated groups showed approximately the same number of spermiating fish, which produced small amounts of sperm after gentle pressure of the abdomen (Table 2). In addition, no statistical differences were detected between GnRHa-treated and untreated fish in sperm volume, Sct, SD or SMD recorded during the treatment period (Table 2).

### 3.2. Time-course of sexual steroids plasma levels after GnRHa injection

During spring and autumn, plasma E2 levels in females increased at 7 days after GnRHa treatment (Fig. 3). In spring, the increase of plasma E2 levels was stronger in females injected every 3 d with 5  $\mu\text{g}$  GnRHa  $\text{kg}^{-1}$  than in females treated once a week with the same dose of GnRHa (Fig. 3a). In both cases, plasma E2 decreased during the second and third week after

GnRHa treatment reaching levels similar to those in controls. A similar effect on plasma E2 levels was observed in GnRHa-injected females during autumn, but absolute plasma levels were much lower than those determined during spring. In autumn, the highest levels of E2 were detected in some females injected with 1  $\mu\text{g}$  GnRHa  $\text{kg}^{-1}$ , although they were not statistically significant with respect to those from control fish. Females treated with 5  $\mu\text{g}$  GnRHa  $\text{kg}^{-1}$  did not show increased plasma E2 levels (Fig. 3b). During spring and autumn, plasma T decreased as E2 increased, thus showing an inverse relationship with E2 during the period of GnRHa treatment. During spring, T levels were significantly lower in females treated with 5  $\mu\text{g}$  GnRHa  $\text{kg}^{-1}$  every 3 d, and during autumn the females injected with 1  $\mu\text{g}$  GnRHa  $\text{kg}^{-1}$  showed the lowest plasma T levels (Fig. 3c and d).

Plasma T and 11-KT levels were also determined in untreated and GnRHa-treated males (Fig. 4). During spring, plasma T levels did not change after GnRHa treatment (Fig. 3a), while the levels of 11-KT were significantly ( $P < 0.05$ ) elevated in males treated with

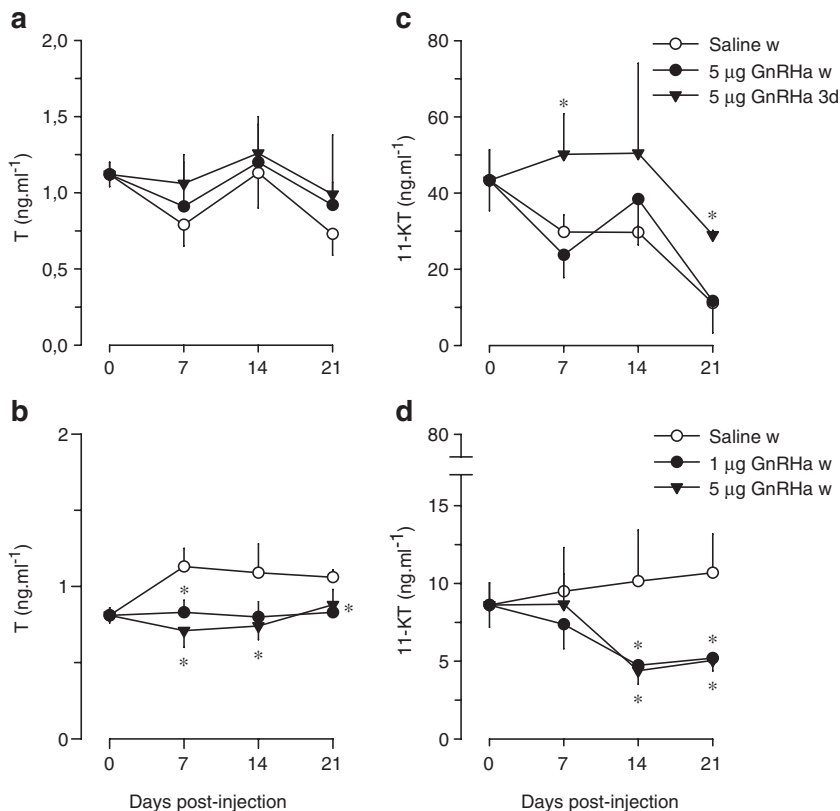


Fig. 4. Changes in plasma levels of testosterone (T) and 11-ketotestosterone (11-KT) in males injected with GnRHa during spring (a and c) and autumn (b and d). Details are as in Fig. 3.

Table 3  
Effect of GnRHa implants or weekly injection on spawning performance of F1 Senegal sole females during spring

Treatment ( $\mu\text{g GnRHa kg}^{-1}$ )	<i>n</i>	Mean weight (kg)	Spawnings ( <i>n</i> )	Total eggs	Relative fecundity ( $\text{eggs kg}^{-1}$ )	Egg buoyancy (%) <sup>a</sup>
Saline	9	1.2±0.1	2	86,000	11,582	97.8; 88.9
5	9	1.0±0.1	0	–	–	–
25	12	1.1±0.1	8	48,000	6138	26.2±9.5 <sup>b</sup>
50	5	1.2±0.1	14	255,000	41,116	61.5±10.3 <sup>a</sup>
5 (injection)	5	1.2±0.1	3	174,000	29,082	51.0±2.6 <sup>a</sup>

The GnRHa implants were administered once and fish were monitored for a period of 20 days. One group was injected once a week with GnRHa for comparison.

Other details as in Table 1.

<sup>a</sup> For saline-implanted fish, the percentage of buoyant eggs for each of the two spawnings recorded are indicated.

5  $\mu\text{g GnRHa kg}^{-1}$  every 3 d (Fig. 4c). During autumn, males had generally lower plasma 11-KT levels than those found during spring, while the levels of T were similar. However, during this time of the year GnRHa treatment appeared to decrease the levels of both androgens, since males injected with 1 or 5  $\mu\text{g GnRHa kg}^{-1}$  showed significantly ( $P < 0.05$ ) lower plasma T and 11-KT levels than those in control fish (Fig. 4b and d).

### 3.3. Induction of spawning by using GnRHa implants

Further experiments were aimed to compare the effectiveness of GnRHa-containing EVAC pellets with

respect to the GnRHa injection in inducing spawning of F1 broodstock during spring. Fish were implanted once for a period of 20 days with a single EVAC pellet containing saline or 5, 25 or 50  $\mu\text{g GnRHa kg}^{-1}$ , while different males and females from the same stock were injected once a week with 5  $\mu\text{g GnRHa kg}^{-1}$  (Table 3). Two spontaneous spawnings were recorded in control females (Table 3 and Fig. 5a), while GnRHa injected females produced three spawnings with a total production of 174,000 eggs (Table 3 and Fig. 5b). Females implanted with GnRHa had a higher number of spawnings than the other experimental groups. Thus, while the dose of 5  $\mu\text{g GnRHa kg}^{-1}$  was ineffective, the doses of

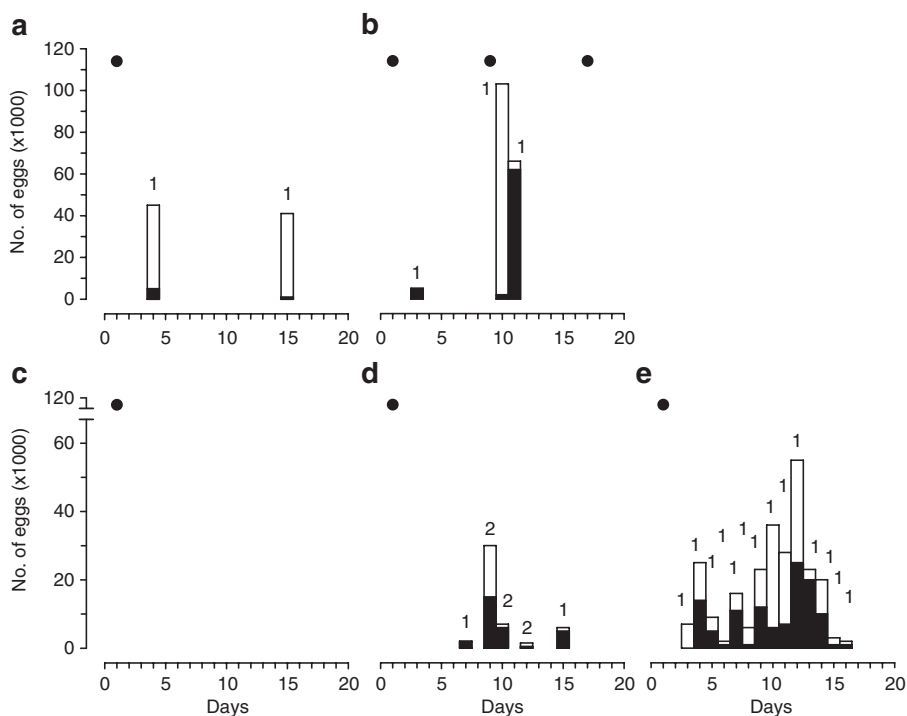


Fig. 5. Daily egg production by Senegal sole females ( $n=5-12$  per treatment) treated with (a) saline implant, (b) weekly intramuscular injection of 5  $\mu\text{g GnRHa kg}^{-1}$ , and a single implant of (c) 5, (d) 25 or (e) 50  $\mu\text{g GnRHa kg}^{-1}$ . The dots in each panel indicate the days of GnRHa injection (b) or implantation (a, c, d, and e). Other details are as in Fig. 2.

25 and 50  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  resulted in 8 and 14 consecutive spawns, with a total production of 48,000 and 255,000 eggs, respectively (Table 3 and Fig. 5c and e). Females implanted with 50  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  showed the first spawning after 3 d from implantation, and daily spawns were observed for a period of 14 days. The percentage of buoyant eggs produced by females implanted with 50  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  or injected with 5  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that observed in females treated with 25  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  (Table 3). However, as observed in previous trials, the eggs produced by all groups were not fertilised.

### 3.4. Response of plasma sexual steroids in males and females to GnRH<sub>a</sub> implants

Plasma levels of sexual steroids were determined in GnRH<sub>a</sub>-implanted males and females after 20 days of

hormonal treatment (Fig. 6). Plasma levels of E2 were significantly ( $P < 0.05$ ) higher in females injected with 5  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  or implanted with 25  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  with respect to those in the saline-implanted females, while those implanted with 50  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  showed E2 levels not different from those in the controls (Fig. 6a). The latter observation was possibly due to the fact that females treated with 50  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  showed most of the ovulations within the first 15 days after GnRH<sub>a</sub> treatment, thus previous to blood sampling. In contrast, plasma T levels did not show changes after GnRH<sub>a</sub> implantation with respect to those of controls.

In males, plasma levels of T and 11-KT were significantly ( $P < 0.05$ ) higher in fish injected with 5  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  or implanted with 25  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  (Fig. 6b). Males implanted with 50  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  showed large variations in the levels of T and 11-KT, and thus these values were not significantly different from those measured in controls.

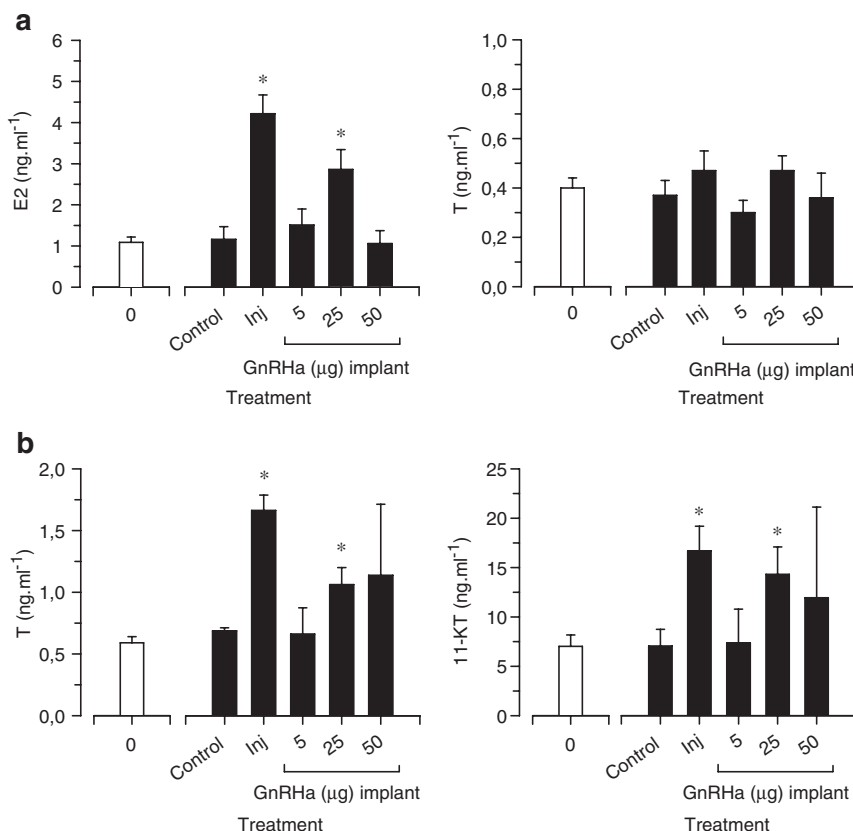


Fig. 6. Plasma levels of 17 $\beta$ -estradiol (E2) and testosterone (T) in females (a) and testosterone (T) and 11-ketotestosterone (11-KT) in males (b) of fish injected weekly with 5  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$ , or treated with a saline implant or with implants containing 5, 25 or 50  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$ . Data are the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3\text{--}5$  fish) of steroid levels determined before (0) and after 20 days of hormonal treatment. The asterisks denote significant differences with respect to the values of saline-implanted fish (ANOVA,  $P < 0.05$ ).



Table 4  
Effect of GnRH<sub>a</sub> implants or weekly injection during spring on sperm production of F1 Senegal sole males after 20 days of treatment

Treatment ( $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$ )	<i>n</i>	Mean weight (kg)	GSI <sup>1</sup>	TSI <sup>2</sup>
Saline	6	0.8±0.1	0.08±0.01	388±45
5	3	0.9±0.1	0.08±0.02	326±84
25	3	0.8±0.1	0.09±0.02	310±78
50	3	0.8±0.0	0.10±0.02	432±61
5 (injection)	3	0.8±0.1	0.11±0.02	238±90

<sup>1</sup>GSI, gonadosomatic index; <sup>2</sup>TSI, testis spermatozoa index. The TSI was calculated from histological sections as described in Materials and methods as an estimation of sperm production in each experimental group.

Other details as in Table 3.

### 3.5. Testis development and milt production of GnRH<sub>a</sub>-implanted males

To avoid to stress the fish during the treatment period, males were sampled only after 20 days of GnRH<sub>a</sub> implantation or weekly injection, and the GSI and TSI were recorded (Table 4). The results indicated that although the treatment of males with GnRH<sub>a</sub> increased T and 11-KT plasma levels, GnRH<sub>a</sub> stimulation did not significantly increase the GSI (Table 4). The TSI calculated on histological sections of the testis in all experimental groups showed that GnRH<sub>a</sub> treatment apparently did not increase the production of spermatozoa (Table 4), even when data were normalized by the weight of the testis (not shown). These observations were consistent with the finding of a similar GSI between untreated and treated fish (Table 4), thus suggesting that GnRH<sub>a</sub> treatment was ineffective in stimulating the production of spermatozoa.

## 4. Discussion

The successful development of Senegal sole aquaculture requires the establishment of protocols for spawning induction in order to predict the timing for egg production and the quality of the gametes. Both in nature and captivity, the onset of spawning of Senegal sole has been related to the rise of temperature during spring (March–June), although some spawnings can also occur during autumn and winter (Arias and Drake, 1990; Cabral and Costa, 1999; Cabral, 2000; Dinis et al., 1999; Anguis and Cañavate, 2005). However, it is often observed that F1 reared females maintained under intensive culture conditions and natural temperature regimes do not spawn spontaneously, despite that the processes of vitellogenesis and FOM apparently take place. In the present work, untreated, control females did

not undergo spontaneous ovulation during spring, or showed two ovulations at the most (Tables 1 and 3), even after controlled fluctuations of the temperature within the range of 16 to 20°C (Fig. 2). These changes of temperature have been recently suggested to trigger spawning in wild Senegal sole adapted to captivity (Anguis and Cañavate, 2005). However, treatment of females with GnRH<sub>a</sub> injection or sustained-release GnRH<sub>a</sub>-loaded implants at the time when females were in advanced or resumed vitellogenesis, proved to be effective in inducing ovulation and spawning (Fig. 1).

The delivery of GnRH agonists has been successfully employed to induce FOM and ovulation in a number of cultured fish species. Mylonas and Zohar (2001) listed nine flatfish species where ovulation and/or spawning was induced using different GnRH<sub>a</sub> delivery systems at doses ranging from 30 to 1000  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . However, the responsiveness of individual fish, in terms of number of spawns and fecundity is variable. The Senegal sole shows a “group-synchronous” ovarian development in which successive batches of vitellogenic oocytes are recruited into FOM and ovulation during the spawning season (Wallace and Selman, 1981; Fig. 1). This pattern of ovarian development, also observed in other flatfish species, often gives rise to multiple ovulations after GnRH<sub>a</sub> treatment (Mylonas and Zohar, 2001). Consistent with these observations, repeated injections with 5  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$ , as well as sustained delivery of 25 or 50  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  through EVAc implants, were able to induce successive and even daily spawnings of Senegal sole females (Tables 1 and 3; Figs. 2 and 5). The intramuscular injection of 5  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$  every 3 d was slightly more efficient than the implantation of 50  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$ -loaded implants (3.8 and 2.8 spawns per female, respectively; Tables 1 and 3), but conclusive comparisons are difficult to establish because different batches of females at slightly different stage of ovarian development were used in each of these experiments. Nevertheless, repeated injections of GnRH<sub>a</sub> require frequent handling of the fish and may cause excessive stress, and therefore the use of 50  $\mu\text{g GnRH}_a \text{ kg}^{-1}$ -loaded implants during spring (May) is possibly the best strategy to induce multiple spawns in Senegal sole.

The plasma levels of gonad steroids in females treated with GnRH<sub>a</sub> during spring showed that plasma E2 increased transiently within a week after hormone treatment and decreased thereafter, while plasma levels of T decreased progressively (Fig. 3a and b). A similar trend in the changes of plasma E2 and T was observed after GnRH<sub>a</sub> treatment during autumn (Fig. 3b and d). An initial increase of plasma E2 concentrations after natural or GnRH<sub>a</sub>-induced spawning has been observed

in marine species with group-synchronous ovaries as Senegal sole, such as the North sea plaice (Scott et al., 1999), yellowtail flounder (*P. ferrugineus*; Larsson et al., 1997), European sea bass (Prat et al., 2001), and greenback flounder (*Rhombosolea tapirina*; Poortenaar and Pankhurst, 2000). During spring, the increase of plasma E<sub>2</sub>, and concomitant decrease of plasma T, preceded the spawns with the highest fecundity (Figs. 2 and 3a), thus suggesting that GnRHa possibly induced a massive recruitment of oocytes into vitellogenesis with increased aromatase activity converting T into E<sub>2</sub>. The subsequent decrease of E<sub>2</sub> plasma levels could be caused by the shift of estrogen into progesterone production by the ovary related to oocyte maturation and ovulation processes. However, these conclusions must await the quantification of endogenous gonadotropin plasma levels after GnRHa treatment.

In contrast to females, treatment of males with GnRHa did not increase the production of spermatozoa, which could be related to the absence of egg fertilisation observed in this work. The ineffectiveness of GnRHa in inducing spermiation in Senegal sole, however, is not totally surprising, since similar results have been obtained in other flatfish species (Mylonas and Zohar, 2001). For example, in both Southern and summer flounder GnRHa-cholesterol pellets were completely ineffective in inducing or enhancing sperm production (Berlinsky et al., 1996, 1997). A better situation was observed in Atlantic halibut producing low milt volume and poor sperm motility at the end of the spawning season, where treatment with GnRHa-containing EVAc implants resulted in an enhancement of milt volume and sperm motility, but also a concomitant decrease in spermatocrit (Vermeirssen et al., 2000, 2004). Similarly, in the North Sea plaice (Vermeirssen et al., 1998), starry flounder (*Platichthys stellatus*; Moon et al., 2003) and greenback flounder (Lim et al., 2004) GnRHa-loaded p [Fad-sa] microspheres or GnRHa-containing cholesterol pellets increased only milt fluidity. The potential stimulatory action of GnRHa implants on sperm motility or milt fluidity in Senegal sole was not thoroughly investigated in the present work, and therefore whether GnRHa treatment has an effect on these parameters, as described in Atlantic halibut and plaice, has not been yet determined.

Nevertheless, the causes of the failure of the GnRHa treatment to induce or enhance sperm production in Senegal sole remain unknown. The present study shows that plasma levels of androgens, T and 11-KT, were significantly increased after GnRHa implantation during spring (Fig. 6b), suggesting that GnRHa treatment was able to stimulate the biosynthesis of these androgens

possibly through the action of released gonadotropins. However, elevation of androgen plasma levels was not associated with an increased number of spermatozoa or milt production in GnRHa-treated males (Table 4). Treatment with GnRHa implants is generally effective at increasing androgen plasma levels in a variety of teleosts including flatfish (Harmin and Crim, 1993; Moon et al., 2003), and thus it seems reasonable to find elevated plasma T and 11-KT levels in GnRHa-treated Senegal sole males. However, large elevations of androgen plasma levels in flatfish are not always associated with enhanced milt volume, since in some species GnRHa is effective in stimulating milt production regardless of the levels of androgens in plasma (Clearwater and Crim, 1998; Vermeirssen et al., 2000; Moon et al., 2003; Lim et al., 2004). These findings in flatfish would be consistent with the current accepted model for most teleosts in which spermatogenesis is regulated by androgens, while progesterones such as 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 $\beta$ P) have been suggested to be the main steroids involved in spermiation and milt hydration (e.g., Borg, 1994; Moon et al., 2003; Vermeirssen et al., 1998, 2004). In the present work, the plasma levels of progesterones were not determined, and therefore the effects of GnRHa on progesterone synthesis and/or conversion in the testis that may explain the ineffectiveness of GnRHa to improve milt production in Senegal sole remain to be investigated.

A potentially interesting observation was the differential responsiveness of males and females to GnRHa treatment between spring and autumn. In May, while the injection of a dose of 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  was effective in inducing spawning, the same dose appeared to be ineffective during October, when a dose of 1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  induced a few spawns (Table 1). In addition, plasma levels of E<sub>2</sub> were increased at 7 days after injection with 5  $\mu\text{g GnRHa kg}^{-1}$  in spring, but these levels were about 10 times lower during autumn and they did not change after the same treatment with GnRHa (Fig. 3a and b). In males, a similar situation apparently occurred, since both T and 11-KT plasma levels of fish treated once a week with 1 or 5  $\mu\text{g GnRHa kg}^{-1}$  were lower than those of control fish during autumn, unlike to that observed in spring (Fig. 4). These observations may be related to physiological changes throughout the reproductive cycle in the sensitivity of the pituitary and/or gonads to GnRHa and/or gonadotropins, respectively. Although the causes of this differential responsiveness to GnRHa are unknown, several potential mechanisms, such as GnRHa and gonadotropin receptor desensitization or negative feedback mechanisms on gonadotropin release by

steroids, could be involved (e.g., Cerdà et al., 1997; Schulz et al., 2001; Amsterdam et al., 2002). In any event, the elucidation of the processes that may regulate pituitary and/or gonad responsiveness to GnRHa treatment during the reproductive cycle of Senegal sole requires further investigation.

In conclusion, hormonal treatment with GnRHa both through repeated injection or sustained-release implants was able to induce ovulation and spawning of Senegal sole F1 females, which usually fail to reproduce in captivity. However, GnRHa treatment of males was ineffective in stimulating reproductive processes (i.e., increasing spermiation or milt production), which may be related with the absence of egg fertilization in the spawnings produced by GnRHa-treated females. Further studies are needed to identify the social, environmental and endocrine mechanisms regulating male reproduction in Senegal sole, as well as the factors responsible for GnRHa failure in enhancing sperm production, contrary to the situation in most other studied teleosts.

### Acknowledgements

We wish to thank A. Calvo, M. Moure, C. Alvarez, A. Marquez, J. Canoura and J. L. Celades for their assistance during fish maintenance. We also thank A. García-López for his help during steroid determination. This work was supported by grants from the “Junta Asesora de Cultivos Marinos” (JACUMAR) of the Spanish Ministry for Agriculture and Fisheries, and from the Reference Center of Aquaculture, Generalitat de Catalunya, Spain, to J.C.

### References

- Amsterdam, A., Hanoch, T., Dantes, A., Tajima, K., Strauss, J.F., Seger, R., 2002. Mechanisms of gonadotropin desensitization. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187, 69–74.
- Anguis, V., Cañavate, J.P., 2005. Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243, 133–145.
- Aragão, C., Conceição, L.E.C., Martins, D., Rønnestad, I., Gomes, E., Dinis, M.T., 2004a. A balanced dietary amino acid profile improves amino acid retention in post-larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 233, 293–304.
- Aragão, C., Conceição, L.E.C., Fyhn, H.J., Dinis, M.T., 2004b. Estimated amino acid requirements during early ontogeny in fish with different life styles: gilthead seabream (*Sparus aurata*) and Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 242, 589–605.
- Arias, A.M., Drake, P., 1990. Estados juveniles de la ictiofauna en los caños de las salinas de la Bahía de Cádiz. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Cádiz, Spain.
- Bennett, H.S., Wyrick, A.D., Lee, S.W., McNeil, J.H., 1976. Science and art in preparing tissues embedded in plastic for light microscopy, with special reference to glycol methacrylate, glass knives, and simple stains. *Stain Technol.* 51, 7194.
- Berlinsky, D.L., King, W.V., Smith, T.I.J., Hamilton II, R.D., Holloway Jr., J., Sullivan, C.V., 1996. Induced ovulation of Southern flounder *Paralichthys lethostigma* using gonadotropin releasing hormone analogue implants. *J. World Aquac. Soc.* 27, 143–152.
- Berlinsky, D.L., William, K., Hodson, R.G., Sullivan, C.V., 1997. Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus*. *J. World Aquac. Soc.* 28, 79–86.
- Borg, B., 1994. Androgens in teleosts fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109C, 219–245.
- Cabral, H.N., 2000. Distribution and abundance patterns of flatfishes in the Sado Estuary, Portugal. *Estuaries* 23, 351–358.
- Cabral, H., Costa, M.J., 1999. Differential use of nursery areas within the Tagus Estuary by sympatric soles, *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Environ. Biol. Fish.* 56, 389–397.
- Cañavate, J.P., Fernandez-Díaz, C., 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174, 255–263.
- Cañavate, J.P., Anguis, V., Calvo, A., Manchado, M., 2005. Recent developments in the reproduction of the Senegal sole (*Solea senegalensis*) in captivity. *European Aquaculture Society Special Publication*, vol. 35, pp. 154–155.
- Cerdà, J., Selman, K., Hsiao, S.-M., Wallace, R.A., 1997. Evidence for the differential regulation of ovarian follicle responsiveness to human chorionic gonadotropin in vitro in a serranid teleost, *Centropristis striata*. *Aquaculture* 159, 143–157.
- Clearwater, S.J., Crim, L.W., 1998. Gonadotropin releasing hormone-analogue treatment increases sperm motility seminal plasma pH and sperm production in yellowtail flounder *Pleuronectes ferrugineus*. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 349–357.
- Crim, L.W., Bettles, S., 1997. Use of GnRHa analogues in fish culture. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Thompson, M.F. (Eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology, Vol.: Endocrinology and Reproduction*. Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi, pp. 369–382.
- Dinis, M.T., 1986. Quatre Soleidae de l’Estuarie du tague. Reproduction et Croissance. Essai d’Élevage de *Solea senegalensis* Kaup 1858. Thèse d’État ès-Sciences Naturelles, Université de Bretagne Occidentale, France.
- Dinis, M.T., 1992. Aspects of the potential of *Solea senegalensis* Kaup for aquaculture: larval rearing and weaning to artificial diets. *Aquac. Fish. Manage.* 23, 515–520.
- Dinis, M.T., Ribeiro, L., Soares, F., Sarasquete, C., 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and Portugal. *Aquaculture* 176, 27–38.
- Harmin, S.A., Crim, L.W., 1992. Gonadotropic hormone-releasing hormone analog (GnRH-A) induced ovulation and spawning in female winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Aquaculture* 104, 375–390.
- Harmin, S.A., Crim, L.W., 1993. Influence of gonadotropic hormone releasing hormone analog (GnRH-A) on plasma sex steroids profiles and milt production in male winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Fish Physiol. Biochem.* 10, 399–407.
- Howell, B.R., 1997. A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. *Aquaculture* 155, 355–365.
- Larsson, D.G., Mylonas, C.C., Zohar, Y., Crim, L.W., 1997. Gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH-A) induces multiple ovulations of high quality eggs in a cold-water, batch-spawning

- teleost, the yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 54, 1957–1964.
- Lim, H.K., Pankhurst, N.W., Fitzgibbon, Q.P., 2004. Effects of slow release gonadotropin releasing hormone analog on milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder, *Rhombosolea tapirina*. Aquaculture 240, 505–516.
- McDowell, E.M., Trump, B.F., 1976. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. Arch. Pathol. Lab. Med. 100, 405–414.
- Moon, S.H., Lim, H.K., Kwon, J.Y., Lee, J.K., Chang, Y.J., 2003. Increased plasma 17-hydroxyprogesterone and milt production in response to gonadotropin-releasing hormone agonist in captive male starry flounder, *Platichthys stellatus*. Aquaculture 218, 703–716.
- Morais, S., Koven, W., Rønnestad, I., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2005. Dietary protein/lipid ratio affects growth and amino acid and fatty acid absorption and metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) larvae. Aquaculture 246, 347–357.
- Mugnier, C., Guennoc, M., Lebegue, E., Fostier, A., Breton, B., 2000. Induction and synchronisation of spawning in cultivated turbot (*Scophthalmus maximus* L.) broodstock by implantation of a sustained-release GnRH-a pellet. Aquaculture 181, 241–255.
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. Rev. Fish Biol. Fish. 10, 463–491.
- Olmedo, M., Peleteiro, J.B., Cal, R., Linares, F., 2003. Crecimiento de juveniles de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) en Galicia. Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, May 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, Spain, pp. 383–385.
- Poortenaar, C.W., Pankhurst, N.W., 2000. Testosterone treatment augments LHRH-a induced ovulation in greenback flounder. Mar. Freshw. Behav. Physiol. 33, 281–291.
- Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M., 2001. Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH<sub>a</sub>) and pimozide on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Aquaculture 198, 325–338.
- Ramos, J., 1986a. Luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LH-RH<sub>a</sub>) induces precocious ovulation in common sole (*Solea solea* L.). Aquaculture 54, 185–190.
- Ramos, J., 1986b. Induction of spawning in common sole (*Solea solea* L.) with human chorionic gonadotropin (HCG). Aquaculture 56, 239–242.
- Rodríguez, J.L., Souto, B.F., 2003. Engorde del lenguado senegales (*Solea senegalensis* KAUP, 1858) en Galicia con temperatura controlada. Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura, May 2003. Junta de Andalucía, Cádiz, Spain, pp. 407–409.
- Rodríguez, L., Begtashi, I., Zanuy, S., Carrillo, M., 2000. Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: Effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at puberty. Fish Physiol. Biochem. 23, 141–150.
- Rueda-Jasso, R., Conceição, L.E.C., Dias, J., De Coen, W., Gomes, E., Rees, J.F., Soares, F., Dinis, M.T., Sorgeloos, P., 2004. Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. Aquaculture 231, 417–433.
- Schulz, R.W., Vischer, H.F., Cavaco, J.E., Santos, E.M., Tyler, C.R., Goos, H.J., Bogerd, J., 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. Comp. Biochem. Physiol. 129B, 407–417.
- Scott, A.P., Witthames, P.R., Vermeirssen, E.L.M., Carolsfeld, J., 1999. Prolonged-release gonadotropin-releasing hormone analogue implants enhance oocyte final maturation and ovulation, and increase plasma concentrations of sulphated C21 steroids in North Sea plaice. J. Fish Biol. 55, 316–328.
- Tvedt, H.B., Benfey, T.J., Martin-Robichaud, D.J., Power, J., 2001. The relationship between sperm density, sperm motility and fertilization success in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. Aquaculture 194, 191–200.
- Vázquez, R., González, S., Rodríguez, A., Mourente, G., 1994. Biochemical composition of fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac larvae and first-feeding larvae of Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). Aquaculture 119, 273–286.
- Vermeirssen, E.L.M., Scott, A.P., Mylonas, C.C., Zohar, Y., 1998. Gonadotropin-releasing hormone agonist stimulates milt fluidity and plasma concentrations of 17,20-dihydroxylated and 5-reduced, 3-hydroxylated C21 steroids in male plaice (*Pleuronectes platessa*). Gen. Comp. Endocrinol. 112, 163–177.
- Vermeirssen, E.L.M., Shields, R., Mazonza de Quero, C., Scott, A.P., 2000. Gonadotropin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). Fish Physiol. Biochem. 22, 77–87.
- Vermeirssen, E.L.M., Mazonza de Quero, C., Shields, R.J., Norberg, B., Kime, D.E., Scott, A.P., 2004. Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotropin-releasing hormone agonist implant. Aquaculture 230, 547–567.
- Wallace, R.A., Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Am. Zool. 21, 325–343.
- Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture 197, 99–136.