



TRABAJO FIN DE GRADO

**GRADO EN
CIENCIAS DEL MAR**

Reproducción de *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) en cautividad: Inducción hormonal.
Revisión bibliográfica.

Eva M^a Castellar Carranza
Pablo J. Sanchís Benlloch
Evaristo Mañanós Sánchez
Curso 2019 - 2020



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a la Universidad Católica de Valencia por haberme formado como oceanógrafa y por darme la oportunidad de conocer a gente maravillosa a lo largo de estos cinco años. Por ello, gracias, me habéis enseñado a formarme no solo a nivel profesional, sino a nivel personal.

En segundo lugar, quería agradecer al Instituto de Acuicultura Torre la Sal (CSIC), por haberme dado la oportunidad de realizar las prácticas en el centro. Particularmente me gustaría nombrar al Dr. Evaristo Mañanós Sánchez. Me gustaría agradecerle tu apoyo incondicional durante estos últimos meses. Gracias por tus conocimientos, pero sobre todo, por haber confiado en mí desde el primer momento.

A mis compañeros de clase Anna, Alberto, Sara, Esther, Jone, Uxue, Antonio, Miriam, y muchos más. Gracias por hacerme sonreír en los peores momentos, por dedicar parte de vuestro tiempo durante estos meses.

A mi tutor, Pablo Sanchís, por su acompañamiento y apoyo durante este proceso.

Y por último, y lo más importante en mi vida, es agradecer a mis padres. Gracias por apoyarme en todas mis decisiones, mis idas y venidas, por los buenos consejos, pero sobre todo, por el esfuerzo que realizáis cada día para que pueda cumplir mis sueños, ser oceanógrafa.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Descripción general de la especie <i>Solea senegalensis</i>	5
1.2. Evolución del cultivo del lenguado senegalés	7
1.3. Regulación hormonal de la reproducción	9
1.4. Disfunciones reproductivas en acuicultura	12
1.5. Técnicas de inducción hormonal a la reproducción.....	13
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
3.1. Bases de datos	17
3.2. Criterios de exclusión.....	18
3.3. Criterios de inclusión.....	18
3.4. Ecuaciones de búsqueda.....	19
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSIÓN	25
6. CONCLUSIONES	41
7. LÍNEAS FUTURAS	42
8. BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la acuicultura y la pesca desde 1950 hasta 2017	3
Figura 2. Distribución de la producción acuícola en los 5 continentes	4
Figura 3. Morfología del lenguado senegalés.....	5
Figura 4. Distribución de <i>Solea senegalensis</i>	6
Figura 5. Ciclo reproductivo en cautividad del lenguado	8
Figura 6. Mapa conceptual del eje hipotalámico-hipófisis-gónada.	10
Figura 7. Niveles plasmáticos de E2, T en hembras.	27
Figura 8. Niveles plasmáticos de E2 y T en hembras tratadas con inyecciones de GnRHa.	27
Figura 9. Fecundidad relativa después de varios tratamientos con: disolución salina (control, CNT), inyección con GnRHa (INJ) o microesferas (MIC).....	28
Figura 10. Fecundidad relativa observada después de aplicar inyecciones con GnRHa	29
Figura 11. Niveles plasmáticos de T y 11-KT en machos tratados con: grupo control (CNT), inyecciones con GnRHa (GINJ), implantes (GIMP) o inyecciones de hCG (hCG).	31
Figura 12. Niveles plasmáticos en los diferentes meses de 11-KT (A) y T (B). Volumen, concentración de esperma y motilidad de los espermatozoides en los diferentes meses (C)	32
Figura 13. Fecundidad total. Los tratamientos han sido los siguientes: control (CNT), inyecciones de GnRHa (GINJ), implantes GnRHa (GIMP) o inyecciones múltiples de hCG (hCG).	34
Figura 14. Volumen, concentración y producción total de esperma en machos tratados con pimozide (PIM), GnRHa, y la combinación de ambos tratamientos	35
Figura 15. Niveles plasmáticos de T y 11-KT en machos y niveles de E2 y T en hembras. Los tratamientos aplicados son pimozide (PIM), GnRHa y la combinación de ambos.	36
Figura 16. Producción de esperma en machos tratados con rLH y rFSH con diferentes dosis durante primavera y otoño.	38
Figura 17. Efectos de los tratamientos con 50 µg/kg de GnRHa con o sin OA en la producción y motilidad del esperma del lenguado senegalés.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descriptores, sinónimos o palabras relacionadas y la traducción en inglés	19
Tabla 2. Ecuaciones de búsqueda en las diferentes bases de datos. Búsquedas realizadas en el mes de Abril y Mayo del 2020.	20
Tabla 3. Tratamientos hormonales.....	22
Tabla 4. Resultados ecuación de búsqueda 1.....	23
Tabla 5. Resultados ecuación de búsqueda 2.....	23
Tabla 6. Resultados ecuación de búsqueda 3.....	24
Tabla 7. Resultados ecuación de búsqueda 4.....	24
Tabla 8. Artículos totales seleccionados en las ecuaciones de búsqueda	24

ABREVIATURAS

11-KT: 11-Cetotestosterona

17 α , 20 β -DHP: 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one

CHO: células derivadas del ovario de hámster chino

cPE: Extractos de la pituitaria de la carpa

DAnt: Antagonista de la dopamina

E2: Estradiol

EVAc: Co-polímero de etileno-vinil acetato

F1: nacidos en cautividad; generación F1

FOM: Maduración final del ovocito

FSH: Hormona foliculoestimulante

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina

GnRH α : Agonista de la hormona liberadora de gonadotropina

GTH: Gonadotrofinas o gonadotropinas

hCG: Gonadotropina coriónica humana

LH: Hormona luteinizante

MIS: Esteroides inductores de la maduración

OA: 11-Ketoandrostenediona

PIM: pimozide

PMSG: Gonadotropina sérica de yegua preñada

sPE: Extractos de la pituitaria del salmón

T: Testosterona

VTG: Vitelogenina

RESUMEN

El lenguado senegalés es una especie apreciada en la acuicultura española y europea, pero el desarrollo de su producción industrial todavía se ve limitado por importantes problemas reproductivos. Actualmente, el cultivo del lenguado depende de los reproductores de origen salvaje mantenidos en condiciones de cautividad, ya que los reproductores F1 (individuos nacidos y criados en cautividad) no desovan de manera espontánea y cuando lo hacen, los huevos no están fertilizados. La aplicación de tratamientos hormonales puede solucionar algunos de los problemas reproductivos observados como se ha demostrado en otras especies de teleósteos.

En el presente trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica de los tratamientos hormonales que se han investigado para estimular la espermatogénesis y la espermiación en machos y aquellos que estimulan la maduración, ovulación y puesta en las hembras de esta especie. Para ello se han utilizado diversas bases de datos a través de ecuaciones de búsqueda diseñadas con palabras clave relacionadas con el objetivo principal.

Los tratamientos que estimulan la espermatogénesis y la producción de esperma en machos, están basados en gonadotropinas recombinantes, hCG e implantes de GnRHa, en éste último combinados con 11-Ketoandrostenediona o pimozide. Los tratamientos que estimulan la ovulación y el desove en las hembras se basan principalmente en la administración de GnRHa.

El problema reproductivo de esta especie puede deberse a disfunciones reproductivas que conllevan a la ausencia del comportamiento reproductivo. Como se ha demostrado, los tratamientos hormonales son eficaces en estimular diversos aspectos reproductivos, pero son ineficaces en estimular el comportamiento reproductivo.

Palabras clave: *Solea senegalensis*, acuicultura, reproducción, técnicas de inducción hormonal.

ABSTRACT

The Senegalese sole is a valued species in Spanish and European aquaculture, but the development of its industrial production is still limited by important reproductive problems. Currently, sole culture depends on wild breeders maintained in captive conditions, since F1 breeders (individuals born and bred in captivity) do not spawn spontaneously and when they do, the eggs are not fertilized. The application of hormonal treatments may solve some of the reproductive problems observed as has been shown in other teleosteal species.

In the present work, a bibliographic review of the hormonal treatments that have been investigated to stimulate spermatogenesis and spermiation in males and those that stimulate maturation, ovulation, and laying in females of this species has been carried out. For this purpose, several databases have been used through search equations designed with keywords related to the main objective.

The treatments that stimulate spermatogenesis and sperm production in males are based on recombinant gonadotropins, hCG, and GnRH α implants, in the latter combined with 11-Ketoandrostenedione or pimozide. The treatments that stimulate ovulation and spawning in females are mainly based on the administration of GnRH α .

The reproductive problem of this species may be due to reproductive dysfunctions that lead to the absence of reproductive behavior. As demonstrated, hormonal treatments are effective in stimulating various reproductive aspects but are ineffective in stimulating reproductive behavior.

Keywords: *Solea senegalensis, aquaculture, reproduction, hormonal induction.*

1. INTRODUCCIÓN

Una de las principales fuentes de proteína animal de elevada calidad, es la procedente del medio acuático. Además de proporcionar proteínas, contienen vitaminas A, B y D, ácidos grasos esenciales Omega-3 (DHA y EPA) y minerales (FAO, 2020).

Debido a las propiedades nutricionales de los productos de origen acuático, hay un alto interés por la población en consumirlos. La alta demanda, sólo puede satisfacerse mediante la combinación de la pesca y la acuicultura. Hay que recordar que la acuicultura consiste en la producción controlada de especies animales y vegetales de origen acuático, utilizando diferentes técnicas de cultivo (FAO, 2020).

El desarrollo tecnológico en el ámbito pesquero y la sobreexplotación de los recursos pesqueros, hace que la explotación de los recursos naturales se vea limitada y con poca previsión de poder aumentar en el futuro. Es por ello, que en los últimos años (Figura 1), ha habido un interés creciente en el ámbito de la acuicultura, ya que sería la única alternativa factible a cubrir la creciente demanda de productos acuáticos de la población en el futuro. En 2017 se registró un total de 111,9 millones de toneladas de producción acuícola superando a la pesca de captura en 18,3 millones de toneladas. La FAO considera que la acuicultura proporciona una mayor seguridad alimentaria y un desarrollo económico de manera sostenible (APROMAR, 2019).

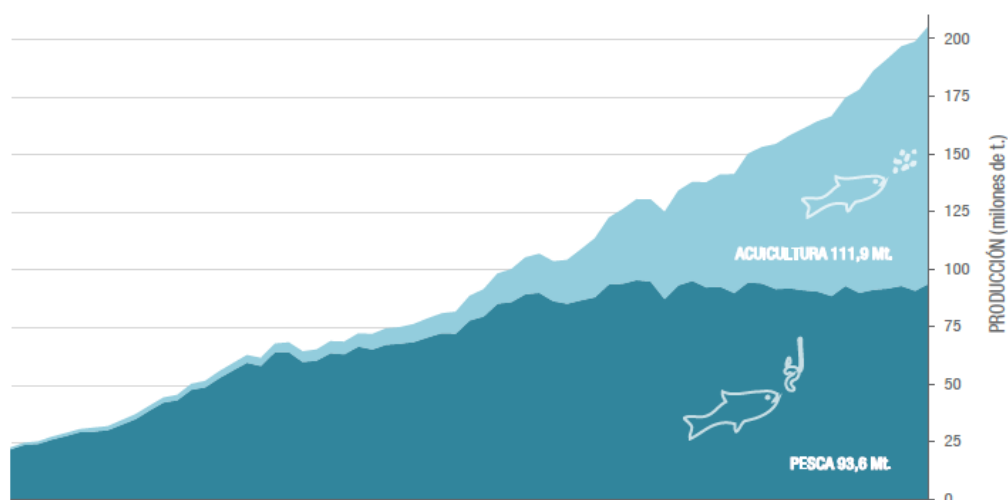


Figura 1. Evolución de la acuicultura y la pesca desde 1950 hasta 2017. Fuente: APROMAR, 2019.

La distribución de la acuicultura se muestra en la figura 2. Como se puede observar, se centra principalmente en Asia con un 92%, seguido de América con 3,2%, Europa con 2,7%, África con 2% y en menor proporción, Oceanía con 0,2% (APROMAR, 2019).

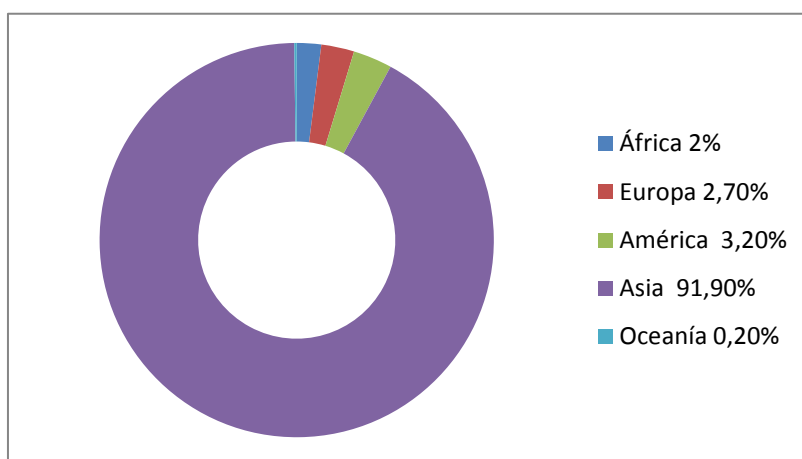


Figura 2. Distribución de la producción acuícola en los 5 continentes. Fuente: APROMAR, 2019.

La producción acuícola española durante los años ochenta, se centraba principalmente en el cultivo de mejillón y trucha arcoíris. A partir de los años noventa y gracias a un importante esfuerzo en I+D y el desarrollo de nuevas tecnologías en el sector, se incorporaron a la producción industrial española la lubina y la dorada además del rodaballo. Éste último centrado en el Norte de España. Actualmente, las especies de peces más cultivadas en España siguen siendo la lubina, la dorada y el rodaballo, pero el sector se está diversificando rápidamente al cultivo de lenguado, anguila, corvina, besugo y salmón del atlántico (APROMAR, 2019).

1.1. Descripción general de la especie *Solea senegalensis*

Desde Bauchot y Pras (1980), *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) corresponde a la presente sistemática:

Tipo: Vertebrata
Subtipo: Gnathosmata
Superclase: Piscies
Clase: Osteichthyes
Orden: Heterostomata (Pleuronectiformes)
Suborden: Soleoidei
Familia: Soleidae
Subfamilia: Soleinae
Género: *Solea*
Especie: *senegalensis*

El lenguado senegalés presenta un cuerpo ovalado, comprimido y plano, con los dos ojos situados en el lado derecho. Se singulariza por un hocico circular y una boca más o menos arqueada situada por debajo del ojo derecho. El preopérculo se encuentra cubierto por escamas y piel. La aleta dorsal empieza por delante de los ojos y junto con la aleta anal se alarga por toda la periferia del cuerpo. La aleta caudal está separada por la anal y la dorsal. La aleta pectoral del lado ocular se caracteriza por una membrana interrredial de color negro, lo cual permite diferenciar a ésta especie del lenguado común (*Solea solea*), que posee un punto negro muy similar pero localizado en la zona posterior de la aleta. La línea lateral empieza desde la parte de los ojos hasta la mitad del cuerpo, con una forma curva redondeada (Ben-Tuvia, 1990). La coloración en el lado ocular varía entre un marrón verdoso a un marrón anaranjado (López *et al.*, 2005). Las características descritas pueden observarse en la figura 3.



Figura 3. Morfología del lenguado senegalés. Fuente: ICTIOTERM, 2004.

Habita en fondos arenosos o fangosos entre los 12 y los 65 metros de profundidad, por lo que es considerada una especie bentónica. Se localiza (Figura 4) en la costa Atlántica oriental desde el Golfo de Guinea hasta Vizcaya, en aguas del Mediterráneo y en el norte de África (Arias *et al.*, 1990).



Figura 4. Distribución de *Solea senegalensis*. Fuente: Aquamaps, 2019.

Capturan el alimento en el subsistema bentónico en el cual, se alimentan de bivalvos, pequeños crustáceos y poliquetos (Bayarri *et al.*, 2004).

La reproducción de *Solea senegalensis* se da durante todo el año, presentando un pico en primavera. La pubertad tiene lugar a los 2-3 años en machos y a los 3-4 años en hembras, aproximadamente a los 25-30 cm de longitud (Dinis *et al.*, 1999). Las larvas son pelágicas, con simetría bilateral y ocupando toda la columna de agua durante los 10-12 primeros días de vida, tras lo cual sufren una metamorfosis dando lugar a juveniles asimétricos (Dinis *et al.*, 1999; Navas, 2017).

1.2. Evolución del cultivo del lenguado senegalés

Los pioneros de la acuicultura del lenguado senegalés fueron, Rodríguez en el litoral gaditano en el año 1984 y Dinis en los estuarios portugueses en 1986, zonas donde se cultivaba de forma extensiva (Cañavate, 2011). En España, durante la década de los 90, se produce un aumento en la producción de las especies de dorada, lubina y rodaballo. Éste aumento provocó la saturación del mercado, por lo que tuvieron que investigar otras especies para sustentar la demanda, siendo una de ellas, el lenguado senegalés. Los investigadores optaron por desarrollar el cultivo del lenguado senegalés por su alta tasa de crecimiento en comparación con el común (Cañavate, 2005).

Los inicios del cultivo del lenguado senegalés se realizaron en , empresas y centros de investigación localizados en el área suratlántica peninsular, centrándose principalmente en la reproducción en cautividad y basándose en métodos zootécnicos tradicionales, ya que no existían bases científicas sólidas en el lenguado senegalés. En 1999, Dinis describe la obtención de puestas fecundadas durante 4 años seguidos. Además en el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA, Cádiz), pionero en la investigación y cultivo de lenguado, describen la reproducción de los reproductores mantenidos en cautividad, aunque de origen salvaje, de manera natural y de forma controlada desde el 1991. Los huevos obtenidos han permitido la distribución de larvas en el sector acuícola y en centros de investigación que ha llevado al desarrollo de técnicas para la producción a gran escala (Cañavate *et al.*, 1999; Dinis *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2001; Calvo *et al.*, 2005).

Desde inicios de siglo, hay un creciente interés en la producción de la especie en España, lo que propicia la financiación de los Planes Nacionales para el cultivo del lenguado, dirigidos por la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) desde el 2002 hasta 2011. Estos planes, junto con otras subvenciones públicas y privadas, han promovido un gran esfuerzo en I+D en el desarrollo de la acuicultura de esta especie, principalmente en centros de investigación de las comunidades de Murcia, Cantabria, Galicia , Cataluña y Valencia (Cañavate, 2011). En 2018 ya se considera consolidada la producción industrial del lenguado en el sector acuícola, con una producción de 774 toneladas, siendo los productores principales Andalucía, Canarias, Galicia y Portugal (APROMAR, 2019).

Actualmente el cultivo de *S.senegalensis* (Figura 5) depende de los reproductores de origen salvaje, aquellos capturados del medio natural y que posteriormente se

mantiene en condiciones de cautividad. Durante la aclimatación a los centros, se alimentan con anélidos y mejillón, que posteriormente se les cambia por alimento inerte. Estos reproductores realizan las puestas en cautividad sin ningún problema, dando lugar a puestas fecundadas y larvas de la cual, depende la industria acuícola actual (FAO, 2020).

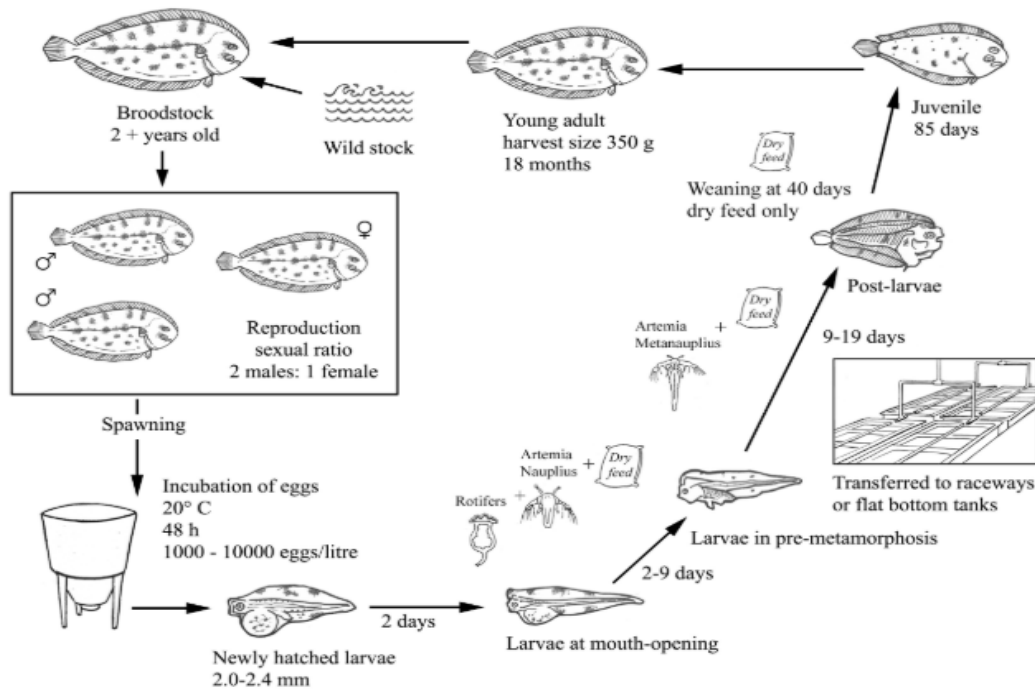


Figura 5. Ciclo reproductivo en cautividad del lenguado. Fuente: FAO, 2014.

Los huevos flotantes proporcionados por los reproductores, se recogen utilizando colectores de superficie y se incuban en incubadores cilíndricos cónicos con unas condiciones óptimas de temperatura, luz, salinidad, aireación y renovación de agua. Cuando los huevos eclosionan, las larvas se trasladan a tanques de cultivo larvario. Transcurridos 2-3 días desde la eclosión, las larvas se alimentan a base de rotíferos combinados con fitoplancton marino durante 4-6 días después de la apertura de la boca. Durante esta etapa, los alevines se alimentan con nauplios de artemia a lo largo de 40-60 días hasta el destete (Engrola *et al.*, 2009). Una vez finalizado el destete, los alevines se trasladan a otros tanques donde se realiza el engorde con piensos

comerciales que contienen un 50-60% de contenido proteico hasta que alcanzan la talla comercial 300-350 g (Rasines, 2013).

El cultivo del lenguado senegalés todavía precisa de investigación en el campo de la nutrición, ya que no se dispone de dietas específicas para la especie, que sean adecuadas para cada fase del cultivo. Una inadecuada alimentación puede provocar innumerables alteraciones fisiológicas y problemas tales como malformaciones esqueléticas y malpigmentación durante la fase larvaria, bajas tasas de crecimiento durante el engorde, baja eficiencia reproductiva de los reproductores, depresión del sistema inmune y la presencia de patologías durante la fase de preengorde y engorde. Sin embargo, cabe decir que los problemas que han limitado y limitan el desarrollo del cultivo del lenguado a gran escala son principalmente las patologías y el control de la reproducción (Fernández *et al.*, 2009). En cuanto a las patologías, principalmente bacterianas (*Photobacterium damsela*, flexibacteriosis marina, vibriosis, edwardsielosis etc) afectan a todas las fases de desarrollo, desde larvas hasta adultos. En cuanto a la reproducción, el principal problema es el control de la reproducción de los reproductores nacidos y criados en cautividad, la primera generación (F1), que son incapaces de producir puestas de huevos fecundadas, a diferencia de los ejemplares salvajes, que si producen huevos fecundados en cautividad (Guzmán *et al.*, 2009). Comparando las tasas de fecundación, los reproductores salvajes tienen un porcentaje de fertilización que varía entre 44.9 ± 18 y 78.46 ± 2.93 , mientras que los reproductores F1, que sí son capaces de producir puesta de huevos en los tanques aunque en menor cantidad que los salvajes, la tasa de fecundación es nula (Calvo *et al.*, 2005). La razón por la cual las tasas de fertilización sean nulas se debe posiblemente a una disfunción reproductiva que conlleva la ausencia del comportamiento reproductivo en los individuos F1 (Carazo, 2013).

1.3. Regulación hormonal de la reproducción

La reproducción en teleósteos, como en otros vertebrados, se regula mediante la cascada hormonal que se produce en el eje cerebro-hipófisis-gónada. El cerebro integra los factores internos y externos (luz, temperatura y salinidad) desencadenando los mecanismos de regulación neuronal que inician el proceso reproductivo (Figura 6) (Weltzien *et al.*, 2004).

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), es una neurohormona de amplia distribución en el cerebro y es el principal sistema cerebral encargado de regular y estimular la síntesis de gonadotropinas (GTHs) en la hipófisis, la hormona folículo-estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Agulleiro *et al.*, 2006).

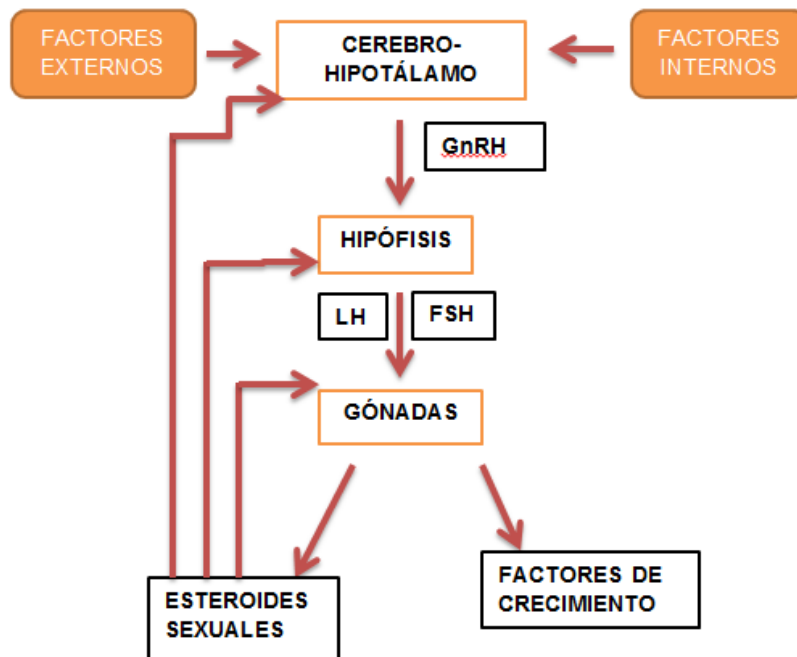


Figura 6. Mapa conceptual del eje hipotalámico-hipófisis-gónada. La GnRH se estimula por factores internos o externos, los cuales estimulan la liberación de las hormonas LH y FSH. Cuando ambas llegan a las gónadas, las gonadotropinas estimulan la síntesis de factores de crecimiento y los esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos, progestágeno). Fuente: Elaboración propia.

Las GTHs circulan por el torrente sanguíneo hasta las gónadas, donde inducen la síntesis de esteroides sexuales y junto con ellos, regulan el crecimiento y la maduración de la gónada. La FSH tiene una función predominante en regular las primeras fases de la gametogénesis, estimulando la síntesis de andrógenos en las hembras. La LH regula principalmente las fases finales de desarrollo, maduración de las gónadas, la espermiación y la ovulación (Mañanós *et al.*, 2008).

Así, en los machos, la gametogénesis se caracteriza por presentar altos niveles en sangre de FSH y andrógenos principalmente, la testosterona (T) y la 11-Cetotestosterona (11-KT). En las hembras, la gametogénesis se caracteriza por altos niveles de FSH y estrógenos, principalmente el E₂, que además de regular la gametogénesis, induce la síntesis de vitelogenina (VTG) en el hígado, proteína de

gran importancia en la reproducción ya que es la precursora de las reservas vitelinas del huevo. En la etapa final de la gametogénesis, se produce un cambio en las vías esteroidogénicas de la gónada y la secreción hipofisaria de LH, estimula la síntesis y secreción de progestágenos o esteroides inductores de la maduración (MIS) que junto con la LH regulan el proceso de maduración gonadal. Durante esta fase, los niveles sanguíneos de FSH, andrógenos y estrógenos, disminuyen. Por otro lado, aumentan los niveles sanguíneos de LH y MIS. Una vez finalizada la maduración gonadal, la GnRH estimula la secreción masiva de LH hipofisario, que induce la ovulación en las hembras y la espermiación en machos (Weltzien *et al.*, 2004).

- **Neurohormonas del cerebro**

Además de la GnRH, hay otros sistemas neuroendocrinos que regulan la reproducción en peces como la kisspeptina, neuropéptido Y (NPY), serotonina, galanina, ácido gamma-aminobutírico (GABA), neuroquinina B, secretoneurina (SN), hormona inhibidora de la gonadotropinas (GnIH) y la dopamina (Zohar *et al.*,2010; Trudeau *et al.*,2012; Zmora *et al.*,2017).

- **Gonadotropinas**

La hipófisis produce y secreta varias hormonas, con papeles fundamentales en la regulación de diversos procesos fisiológicos. Las gonadotropinas (LH y FSH), sintetizadas en las células gonadotropas, se encargan de regular los procesos reproductivos, en todos los vertebrados (Swanson *et al.*, 2003; Levavi *et al.*, 2010). Las GTHs son hormonas de estructura compleja, compuestas por una subunidad beta específica (FSH β o LH β) y una subunidad alfa (GP α) común a ambas y también común a la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y la gonadotropina coriónica humana (hCG).

- **Hormonas de las gónadas (esteroides sexuales y factores de crecimiento)**

Las gónadas, bajo la influencia reguladora de las secreciones hipofisarias, producen esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos y progestinas) y factores de crecimiento, encargados de regular la proliferación y diferenciación de las células germinales, además de producir efectos de retroalimentación en el cerebro y la hipófisis (Nagahama y Yamashita, 2008; Lubzens *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2010; Schulz y Nóbrega, 2011; Zohar *et al.*, 2015). Los esteroides derivan de la molécula del colesterol, que se transforma en pregnenolona por la enzima citocromo p450_{scc}, dando inicio a una amplia cadena biosintética en la que una multitud de enzimas

específicas se encargan de producir las progesterinas (C21), andrógenos (C19) y estrógenos (C18) (Tokarz *et al.*, 2015).

1.4. Disfunciones reproductivas en acuicultura

El correcto funcionamiento del eje reproductivo es fundamental para que se produzca de manera óptima y adecuada, la maduración de las gónadas y la liberación de gametos viables al medio. Su funcionamiento viene además determinado y sincronizado por los factores ambientales, de forma que, en el medio natural, la liberación de gametos se produce en el momento en que las condiciones externas son las más adecuadas para la supervivencia de los descendientes (Mañanós *et al.*, 2019).

Debido a una posible ausencia, en mayor o menor medida, de las condiciones ambientales apropiadas necesarias para la reproducción de cada especie, el cerebro puede inhibir las secreciones neuroendocrinas y así bloquear o inhibir el eje reproductivo provocando disfunciones en la reproducción (Mañanós *et al.*, 2019).

En la acuicultura, la disfunción reproductiva más habitual observada en los machos, es la disminución en la producción de esperma y el incremento de su viscosidad, lo que puede afectar de manera negativa a su capacidad de fecundación de los óvulos. En hembras se pueden observar 3 tipos de disfunciones reproductivas: 1) inhibición de la vitelogénesis, 2) inhibición de la maduración, en el cual se completa la vitelogénesis pero los ovocitos postvitelogénicos no progresan en el desarrollo y se produce atresia y 3) inhibición del desove, en la cual se completa la maduración y la ovulación, pero los ovocitos permanecen en la cavidad ovárica o abdominal y no son liberados al medio externo (Mañanós *et al.*, 2019).

La aplicación de tratamientos hormonales puede solucionar algunos de estos problemas reproductivos. Su utilización es una práctica común en la acuicultura, no solo para solucionar problemas graves de reproducción, sino también para optimizar la reproducción de aquellas especies que se reproducen de manera inadecuada (Zohar y Mylonas, 2001).

1.5. Técnicas de inducción hormonal a la reproducción

Los tratamientos hormonales aplicados en la acuicultura estimulan la espermatogénesis y la producción de espermatozoides en los machos y la maduración de los ovocitos, ovulación y el desove en las hembras de diversas especies de teleósteos (Mylonas *et al.*, 2010).

Los factores que determinan la eficacia de las técnicas hormonales son principalmente el tipo de fármaco, la dosis, el modo de administración y otros factores como la hora del día en la que se administra el tratamiento, la temperatura del agua y el estado de maduración entre otros (Norberg *et al.*, 2004).

Los tratamientos hormonales pueden clasificarse en dos tipos; de primera y segunda generación (Zohar y Mylonas, 2001). Los de primera generación agrupan aquellos fármacos basados en hormonas hipofisarias, e incluyen extractos de hipófisis y GTHs (naturales o recombinantes). Los de segunda generación agrupan fármacos derivados de hormonas del cerebro e incluye agonistas de la GnRH (GnRH_a) y antagonistas de la dopamina (D_{Ant}). Cada tipo actúa en un lugar diferente del eje cerebro-hipófisis-gónada. La G1 actúa directamente sobre las gónadas a diferencia de las G2, que actúan sobre la hipófisis y por lo tanto, indirectamente sobre la gónada a través de la estimulación de la liberación de las gonadotropinas (Mañanós *et al.*, 2019).

• Tratamientos hormonales de primera generación

La hipofisación, homogeneizados pituitarios de peces, fueron las primeras preparaciones utilizadas para la inducción del desove en peces. La base del tratamiento consiste en la extracción de la hipófisis de un pez maduro y su homogenización en una solución tampón que posteriormente se administra en el pez que se va a tratar. Esta solución, induce la ovulación y el desove del pez tratado. El procedimiento que requiere es sencillo, por lo que no requiere de personal especializado. El uso de la hipofisación posee varias desventajas, principalmente la inexactitud del tratamiento, debido a que no se conoce la dosis exacta del componente activo (GTHs) administrado y la transmisión de agentes patógenos, ya que consiste en la administración de material biológico de un ejemplar a otro (Cabrita *et al.*, 2008).

Una mejora del tratamiento de hipofisación serían los extractos hipofisarios (PE), consistentes en preparados enriquecidos con el componente hormonal activo. Los PE

se han utilizado y se utilizan habitualmente en acuicultura, principalmente los disponibles en el mercado, que son los extractos de la pituitaria del salmón (sPE) y de carpa (cPE). En relación con los homogeinizados, mantienen el riesgo de la transmisión de patógenos y la especificidad de la especie (Yaron, 1995; Arabaci *et al.*, 2004).

El último tipo de preparación son las GTHs naturales o recombinantes. Las GTHs naturales se obtienen por purificación de material biológico, principalmente humano y de mamíferos, como son la FSH y la LH aislados de la pituitaria, gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) y la gonadotropina coriónica humana (hCG). También hay disponibles GTHs naturales purificadas de salmónidos y ciprínidos. Las ventajas de su utilización son el bajo coste, la alta disponibilidad y la actividad estandarizada. Sin embargo, debido al tamaño de la proteína y la especificidad para cada especie, puede causar una respuesta inmune si se administran en especies que no son la propia de la que se ha obtenido la GTH (Zohar y Mylonas, 2001). La dificultad de aislar las GTHs dificulta el uso de GTHs específicas para cada especie a tratar (Mañanós *et al.*, 2019).

La dificultad de aislar las GTHs naturales puede resolverse con las GTHs recombinantes. Se obtienen “in vitro” mediante técnicas de ADN recombinante, insertando secuencias de ADN de un organismo en el genoma de otro organismo. No obstante, su producción depende de las nuevas tecnologías.

- **Tratamientos hormonales de la segunda generación**

Dentro de los tratamientos de segunda generación, son sin duda los GnRHa el fármaco más común en los tratamientos hormonales en acuicultura y altamente eficaz en inducir la liberación de LH y la maduración gonadal. En las hembras, induce la FOM, la ovulación y el desove. En los machos, aumenta el volumen de esperma y la cantidad de espermatozoides. La GnRHa tiene importantes ventajas sobre las preparaciones de GTH. Son genéricos y se pueden utilizar en cualquier especie. Además, actúa en la hipófisis induciendo la liberación endógena de los GTHs de los peces (Cabrita *et al.*, 2008). El método de aplicación clásico que se utiliza es a través de inyecciones con diferentes dosis disuelto en solución salina y por vía intraperitoneal o intramuscular. Otro método es a través de sistema de liberación sostenida de los cuales destacan: pellets de colesterol-celulosa, copolímero de etileno-vinil-acetato (EVAc) y microesferas biodegradables.

Los pellets de colesterol son gránulos (3 mm de diámetro × 3 mm de largo, 30 mg) cargados con dosis que varían entre 25-250 µg de GnRHa, que se aplican intramuscularmente o intraperitonealmente con un aplicador (Joachim *et al.*, 1988).

El copolímero de etileno-vinil-acetato puede fabricarse en forma de microesferas o implantes sólidos (Brown *et al.*, 1986). Los implantes EVAc empleados en los peces tienen 2 mm de largo y 2 o 3 mm de diámetro. Se cargan con una dosis de 25-250 µg de GnRHa y se suelen administrar intramuscularmente.

Las microesferas biodegradables (5-200 µm de diámetro) se preparan a través de la disolución de la GnRHa y la matriz (ácido glicólico y ácido DL-láctico) mediante el método de evaporación del disolvente. Cuando se inserta la microesfera, la GnRHa se libera de manera rápida la cual puede persistir varios meses en relación a la cantidad de los ácidos, el peso y la longitud del polímero (Okada *et al.*, 1994).

Además de GnRHa, hay otro tipo de tratamientos hormonales G2, los antagonistas de la dopamina (DAnt). La función del tratamiento consiste en bloquear la acción de la dopamina, imprescindible para estimular la reproducción. La función de la DAnt es diferente en los peces de agua dulce y marinos. Se ha demostrado que el sistema inhibitor de la dopamina es débil o se encuentra ausente en animales marinos, si los comparamos con los de agua dulce. En el mercado se pueden encontrar DAnts que han demostrado ser útiles para los tratamientos hormonales en la acuicultura (pimozida, domperidona y metoclopramida) y que siempre se administran junto con GnRHa (Cabrita *et al.*, 2008; Mañanós *et al.*, 2019).

2. OBJETIVOS

El principal objetivo del Trabajo de Fin de Grado (TFG) de Ciencias del Mar en la Universidad Católica de Valencia es realizar una revisión bibliográfica sobre de las técnicas de inducción hormonal en el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Para llevar a cabo el objetivo principal se requieren de los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la efectividad de los diferentes tratamientos hormonales en la maduración, ovulación y puesta en hembras de *Solea senegalensis*.
- Identificar en la literatura el principal problema reproductivo del lenguado senegalés.
- Recopilar los diferentes tratamientos en la estimulación de la espermiación y espermatogénesis en machos de *Solea senegalensis*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología utilizada para el presente Trabajo de Fin de Grado ha sido el método clásico, cuyo objetivo es detectar y analizar las fuentes de información para obtener el “estado arte” sobre el tema a tratar.

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica sobre las técnicas de inducción hormonal aplicadas en el ámbito de la reproducción del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) en cautividad.

3.1. Bases de datos

Se utilizaron las siguientes bases de datos durante el período del mes de abril hasta mayo del año 2020: Google scholar, WOS, PubMed, ScienceDirect y Dialnet.

- **Google scholar (Google Académico).** Se trata de un motor de búsqueda web de acceso gratuito que contiene textos completos o los metadatos de la literatura académica en diferentes formatos y disciplinas de publicación. Incluye la mayoría de revistas, libros académicos documentos de conferencias, tesis y disertaciones, preimpresiones, resúmenes, informes técnicos y otra literatura académica incluyendo opiniones y patentes judiciales. Posee alrededor de 389 millones de documentos, incluyendo artículos, citas y patentes, por lo que es la base de datos más grande del mundo.
- **PubMed.** Consiste en un motor de búsqueda de libre acceso que permite consultar los contenidos de la base de datos MEDLINE. Es posible acceder a referencias bibliográficas y resúmenes de los artículos de investigación biomédica. Ofrecido por la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos como parte de Entrez, MEDLINE posee 4800 revistas publicadas en los Estados Unidos y en más de 70 países del mundo. Reune aproximadamente más de 30.000.000 citas.
- **ScienceDirect.** Es una de las mayores fuentes de información para la investigación científica, técnica y médica. Ofrece textos completos de revistas científicas que publica Elsevier, capítulos de libros, procedentes de más de 2.500

revistas con revisión por pares y más de 11.000 libros. Posee 9 millones y medio de artículos y capítulos.

- **Dialnet.** Es uno de los mayores portales bibliográficos del mundo, cuya finalidad es proporcionar una visibilidad a la literatura científica hispana. Se centra en el ámbito de las Ciencias Humanas, Jurídicas y Sociales. Dialnet es un proyecto de cooperación que integra diferentes recursos y servicios documentales, desde base de datos, servicio de alertas bibliográficas, hemeroteca virtual hasta repositorio.
- **Web Of Science (WOS):** Base de datos multidisciplinar de referencias bibliográficas. Contiene artículos de revistas, que ofrece el acceso a resúmenes de autor e índices de citas de más de 12.000 publicaciones internacionales de mayor impacto. Además contiene acceso abierto a revistas y más de 15.000 actas de congresos. Forma parte de la Licencia Nacional contratada por la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT).

Para la recopilación de la documentación para la revisión bibliográfica, se definieron los siguientes criterios de exclusión e inclusión que se muestran a continuación:

3.2. Criterios de exclusión

- Artículos, libros, Tesis Doctorales, revisiones o documentos en un idioma diferente al español o el inglés.
- Estudios que no estén relacionados con los objetivos del trabajo.
- Resultados ambiguos.

3.3. Criterios de inclusión

- Artículos, Tesis Doctorales, libros, capítulos de libros o cualquier documento que esté a disposición del público, de acceso libre.
- Documentos publicados en inglés y español.
- Documentos publicados desde los años 80.

3.4. Ecuaciones de búsqueda

Para la selección de los documentos que hemos utilizado en la revisión bibliográfica, se han empleado diversas palabras clave relacionadas con el objetivo principal del trabajo. Los descriptores o palabras clave se conectaron con los diferentes tipos de operadores booleanos. Se utilizaron los siguientes operadores booleanos: (OR), cuando queremos localizar información que contenga cualquiera de los términos que se han buscado, (NOT o NO), el cual buscará documentos que contienen sólo el primer término de la ecuación pero no el segundo y (AND), encargado de seleccionar los documentos donde aparezcan todos los términos definidos en la ecuación de búsqueda.

Para empezar a crear la ecuación de búsqueda, se ha realizado una tabla (1) con las palabras clave, los sinónimos o palabras relacionadas con el concepto y la traducción en inglés, ya que es el idioma en el que encontramos una mayor cantidad de documentos en las bases de datos.

Tabla 1. Descriptores, sinónimos o palabras relacionadas y la traducción en inglés.

PALABRA CLAVE	SINÓNIMO / PALABRAS RELACIONADAS	TRADUCCIÓN EN INGLÉS
<i>Solea senegalensis</i>	Lenguado senegalés	Senegalese sole Senegal sole
Acuicultura	Cautividad	Aquaculture Farming Captivity Culture
Reproducción	Reproductores cultivados (Primera generación F1)	Reproduction Cultured broodstock (first generation, F1)
Técnicas de inducción hormonal	Inducción hormonal Tratamiento hormonal Estimulación hormonal en machos Estimulación hormonal en hembras Inducción hormonal a la espermiación y espermatogénesis Inducción hormonal al desoven maduración y puesta en hembras	Hormonal induction Hormonal treatment Treatments on the stimulation of male Treatments on the stimulation of female Hormonal induction of spermiation and spermatogénesis in males. Hormonal spawning, maturation and ovulation induction in females

Posteriormente de haber creado la tabla con las palabras clave relacionadas con el objetivo principal de la revisión bibliográfica, se crearon cuatro ecuaciones de búsqueda utilizando las palabras clave, sus sinónimos o las relaciones y la traducción

al inglés, los cuales se conectaron con los operadores booleanos. Las siguientes ecuaciones de búsqueda que se muestran en la tabla 2 se aplicaron a las bases de datos descritas en el apartado 3.1 y se obtuvieron unos resultados que se podrán observar en el apartado siguiente.

Tabla 2. Ecuaciones de búsqueda en las diferentes bases de datos. Búsquedas realizadas en el mes de Abril y Mayo del 2020.

ABREVIATURA	ECUACIÓN DE BÚSQUEDA
EC1	(Lenguado senegalés OR <i>Solea senegalensis</i>) AND (Acuicultura OR Culture) AND (Inducción hormonal OR Hormonal induction)
EC2	(<i>Solea senegalensis</i> OR Lenguado senegalés OR Senegalese sole) AND (Breeders broodstock OR First generation) AND (Hormonal induction OR Hormonal treatments)
EC3	(<i>Solea senegalensis</i> OR senegal sole) AND (Treatments OR Stimulation) AND (Spermiation OR Spermatogenesis)
EC4	(<i>Solea senegalensis</i> OR senegal sole) AND (Treatment* OR Stimulation) AND (Ovulation OR Maturation OR Spawning)

Debido a que el objetivo principal del Trabajo de Fin de Grado es la búsqueda bibliográfica sobre los tratamientos de inducción hormonal en el lenguado senegalés, a continuación se presentan los motivos del diseño de cada ecuación de búsqueda.

- **EC1:** Contiene el nombre de la especie "*Solea senegalensis*", "Acuicultura" y "Inducción hormonal". Como puede observarse, esta ecuación de búsqueda se ha empleado para obtener una visión general sobre el objetivo principal, técnicas de inducción hormonal.
- **EC2:** Contiene el nombre de la especie "Lenguado senegalés", "Reproductores de la primera generación, F1" y "Tratamientos hormonales". Esta ecuación de búsqueda es muy similar a la anterior, pero en este caso se quiere obtener una mayor información acerca de los tratamientos de inducción hormonal en los reproductores de la primera generación, puesto que son los que presentan disfunciones reproductivas y es en ellos en los que se aplican los tratamientos.

Las ecuaciones de búsqueda (EC1 y EC2) son de carácter general, por lo que para indagar más en las técnicas de inducción hormonal que se aplican en el lenguado senegalés, se han diseñado otras dos ecuaciones de carácter específico.

- **EC3:** Contiene “*Solea senegalensis*”, “Inducción hormonal” y para especificar la búsqueda, se añade “Inducción hormonal en la espermiación y en la espermatogénesis en machos” para conocer los tratamientos aplicados en los machos que presentan problemas reproductivos.
- **EC4:** Contiene “Lenguado senegalés”, “Inducción hormonal” e “Inducción hormonal en la maduración, ovulación y desove en hembras”, con la misma finalidad que tiene la EC3 pero en el caso de las hembras.

Durante la búsqueda bibliográfica se utilizaron los campos rango de años en los que nos ha interesado la publicación de documentos, título y el autor. En muchos casos, debido a que las bases de datos empleadas no tenían todos los campos o no se han podido aplicar los campos que hemos querido incluir o excluir, se han buscado documentos específicos con el título de “*Solea senegalensis*”, “Técnicas de inducción a la reproducción en el lenguado senegalés” y artículos, revisiones o libros publicados dentro de los documentos encontrados.

4. RESULTADOS

Varias especies de peces mantenidas en cautividad sufren problemas en la reproducción. La mayoría de estas disfunciones reproductivas se asocian más a las hembras que a los machos, es por ello, que los tratamientos hormonales se aplican en mayor proporción a las hembras.

En cuanto a la proporción de documentos encontrados, hay una mayor cantidad de artículos dedicados a tratamientos hormonales aplicados en machos. Teniendo en cuenta que los tratamientos hormonales no han estimulado la fertilización de los desoves de las hembras F1, se ha investigado a los machos de esta especie. A través de varios trabajos, han determinado que los machos salvajes producen un bajo volumen de esperma, y además, éste se reduce significativamente en los machos F1. Por estas razones, el presente trabajo de fin de grado contiene una variedad de tratamientos hormonales dirigidos a estimular la espermatogénesis y la espermiación.

A continuación se clasifican los tratamientos hormonales descritos en los documentos seleccionados aplicados en el lenguado senegalés. Se han clasificado según el tipo de fármaco y el número de estudios (Tabla 3).

Tabla 3. Tratamientos hormonales

TRATAMIENTO HORMONAL	ARTÍCULOS TOTALES
GnRHa + Dilución salina	10
Implantes EVAc + GnRHa	7
Implantes EVAc + hCG	1
Antagonista de la dopamina: Pimozide (PIM)	1
PIM + GnRHa	1
Esteroides 17 20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β P)	1
Hormonas recombinantes (rFSH y rLH)	2
Microesferas de GnRHa	1
Implante 11-Keto androstenediona	2
Gonadotropina coriónica humana (hCG)	2

Los resultados obtenidos mediante las ecuaciones de búsqueda en las diferentes bases de datos se muestran en las tablas 4-7.

Se han obtenido un total de 187 resultados a través de la EC1, de los cuales se han seleccionado solo 15. A pesar del total de artículos encontrados, la ecuación de búsqueda sugiere que hay muchos trabajos basados en la especie, no obstante, no se encontraron los suficientes en relación al objetivo principal. Como se puede apreciar, la base de datos ScienceDirect dio más resultados que la Dialnet.

Tabla 4. Resultados ecuación de búsqueda 1.

EC1	(Lenguado senegalés OR <i>Solea senegalensis</i>) AND (Acuicultura OR Culture) AND (Inducción hormonal OR Hormonal induction)	
FUENTE	ARTÍCULOS TOTALES	ARTÍCULOS SELECCIONADOS
Dialnet	0	0
PubMed	2	2
ScienceDirect	140	6
Google scholar	42	5
WOS	3	2
TOTAL	187	15

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos con la EC2. El total de documentos localizados han sido 852, de los cuales se seleccionaron 17. Se han encontrado más resultados a través de esta ecuación de búsqueda posiblemente, debido a la adición de la palabra clave “primera generación” ya que como se ha explicado en la introducción, son los que presentan disfunciones reproductivas, y por ende, a los que aplican los tratamientos de inducción hormonal. Como se puede apreciar, en este caso se han localizado más artículos en la base de datos GoogleScholar, seguido de ScienceDirect.

Tabla 5. Resultados ecuación de búsqueda 2.

EC2	(<i>Solea senegalensis</i> OR lenguado senegales OR Senegalese sole) AND (Breeders broodstock OR First generation) AND (Hormonal induction OR Hormonal treatments)	
FUENTE	ARTÍCULOS TOTALES	ARTÍCULOS SELECCIONADOS
Dialnet	0	0
PubMed	0	0
ScienceDirect	191	7
Google scholar	659	8
WOS	2	2
TOTAL	852	17

A continuación se muestran los resultados obtenidos a través de la EC3 y EC4, las cuales, son más específicas que las descritas anteriormente.

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en la EC3. Con un total de 854 documentos, se han seleccionado 14. Los datos sugieren que hay muchos trabajos realizados en los machos de esta especie. Se han localizado más documentos en la base de datos Google Scholar en comparación con las otras bases de datos.

Tabla 6. Resultados ecuación de búsqueda 3.

EC3	(<i>Solea senegalensis</i> OR senegal sole) AND (Treatments OR Stimulation) AND (Spermiation OR Spermatogenesis)	
FUENTE	ARTÍCULOS TOTALES	ARTÍCULOS SELECCIONADOS
Dialnet	0	0
PubMed	2	2
ScienceDirect	158	6
Google scholar	693	5
WOS	1	1
TOTAL	854	14

Como se observa en la tabla 6, los documentos totales con la EC4 han sido 5.075 y tan solo han sido 10 los seleccionados. Es probable que se hayan encontrado más resultados con esta ecuación de búsqueda ya que la mayoría de los tratamientos se aplican en las hembras.

Tabla 7. Resultados ecuación de búsqueda 4.

EC4	(<i>Solea senegalensis</i> OR senegal sole) AND (Treatment* OR Stimulation) AND (Ovulation OR Maturation OR Spawning)	
FUENTE	ARTÍCULOS TOTALES	ARTÍCULOS SELECCIONADOS
Dialnet	0	0
PubMed	5	2
ScienceDirect	839	4
Google scholar	4.230	3
WOS	1	1
TOTAL	5.075	10

Por lo tanto, el número de artículos totales empleados en todas las ecuaciones de búsqueda han sido 56, de los cuales la mayoría se repetían o no estaban relacionados con el objetivo principal del Trabajo de Fin de Grado, por lo que se llevó a cabo una selección de 18 artículos para realizar la discusión del presente trabajo.

Tabla 8. Artículos totales seleccionados en las ecuaciones de búsqueda.

	ARTÍCULOS TOTALES SELECCIONADOS
EC1	15
EC2	17
EC3	14
EC4	10
TOTAL	56

5. DISCUSIÓN

- **Técnicas de estimulación de la ovulación, maduración y desove en hembras**

La disfunción reproductiva más común en los pleuronectiformes es la inhibición de la liberación de los óvulos después de completar el proceso de maduración oocitaria. El problema de la liberación de huevos al medio puede resolverse extrayendo los huevos del interior de la hembra por masaje abdominal y fecundarlos posteriormente por fertilización artificial, protocolo empleado en muchas especies de peces planos en la acuicultura, como en el rodaballo o el fletan (Mañanós *et al.*, 2008).

Varios estudios confirman que los problemas reproductivos afectan de mayor manera a las hembras F1 que a las hembras de origen salvaje mantenidas en condiciones de cautividad. Un claro ejemplo es el caso de los reproductores salvajes mantenidos en cautividad en las especies: platija japonesa (Tsujigado *et al.*, 1987), rodaballo (Devauchelle *et al.*, 1988), fletán del atlántico (Holmefjord *et al.*, 1993) y lenguado común (Devauchelle *et al.*, 1987), en los que se han descrito desoves espontáneos. Por ende, se ha requerido la extracción de los gametos y su posterior fertilización artificial en las hembras citadas anteriormente.

Las especies *Solea solea* y *Solea senegalensis* se reproducen de manera natural en cautividad y a diferencia de otros pleuronectiformes, los huevos se liberan al tanque sin necesidad de extraerlos manualmente (Guzmán *et al.*, 2008). Sin embargo, en el lenguado senegalés, solo los reproductores salvajes mantenidos en condiciones de cautividad son capaces de desovar de manera espontánea en el tanque y obtener huevos fecundados ya que los F1 muestran una ausencia casi total de desoves fertilizados.

Varios estudios se centran en los efectos causados por la aplicación de los tratamientos hormonales entre los que se incluye la cantidad y calidad de puestas, desarrollo y maduración de los ovocitos (mediante biopsias y estudios histológicos) y la activación del sistema reproductivo femenino.

Los fármacos que se han aplicado se han ensayado en otras especies e incluyen agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas a través de inyecciones e implantes de liberación sostenida y antagonistas dopaminérgicos.

○ **Tratamiento con GnRHa**

La GnRHa es un neuropéptido sintético GnRHa de pequeño tamaño empleado en tratamientos dirigidos a estimular la reproducción, tanto en teleósteos como en otros vertebrados. Los tratamientos con GnRHa resultan ser eficaces en la inducción de la liberación de gonadotrofinas hipofisarias y en la esteroidogénesis, maduración gonadal y los procesos relacionados con la liberación de gametos.

En la revisión de (Zohar y Mylonas, 2001) se han enumerado 9 especies de pleuronectiformes en las que se aplicaron diferentes sistemas de administración de GnRHa con dosis que oscilaban entre 30 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, los cuales resultaron ser eficaces para inducir la ovulación y el desove. Teniendo en cuenta que el lenguado senegalés tiene un desarrollo ovárico de tipo sincrónico por grupos (oocitos en grupos con el mismo estado de desarrollo), al igual que otras especies de peces planos, cuando se administra el tratamiento con GnRHa dan lugar a múltiples ovulaciones (Guzmán *et al.*, 2009).

En el caso de las hembras de lenguado, los métodos de aplicación más empleados (Figura 7) son las inyecciones y los implantes de liberación sostenida cargados con GnRHa como se describen en el trabajo de (Agulleiro *et al.*, 2006), donde comparan por una parte, la efectividad de las inyecciones con diferentes dosis (1,5 y 30) $\mu\text{g}/\text{kg}$ de GnRHa frente a un único implante EVAc (co-polímero de etileno-vinil-acetato) con diferentes dosis (5,25 y 50) $\mu\text{g}/\text{kg}$ de GnRHa. Ambos tratamientos han estimulado la ovulación y la puesta en el tanque. Cabe destacar que la dosis de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ GnRHa en implantes y 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ GnRHa en inyecciones, no ha sido efectiva ya que no se han obtenido puestas en el tanque de las hembras tratadas. Además de estudiar la efectividad del tratamiento, el estudio aporta resultados a nivel endocrino, donde tras la aplicación del tratamiento en ambos casos, se observa una estimulación de la secreción de estrógeno (E_2), salvo en el implante cargado con 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de GnRHa, el cual se mantiene con valores similares al grupo control. No obstante, se reducen los niveles de E_2 en la segunda y tercera semana del tratamiento (Figura 8) en ambos casos, de manera similar al trabajo realizado por (Gozalbo y Josep, 2008).

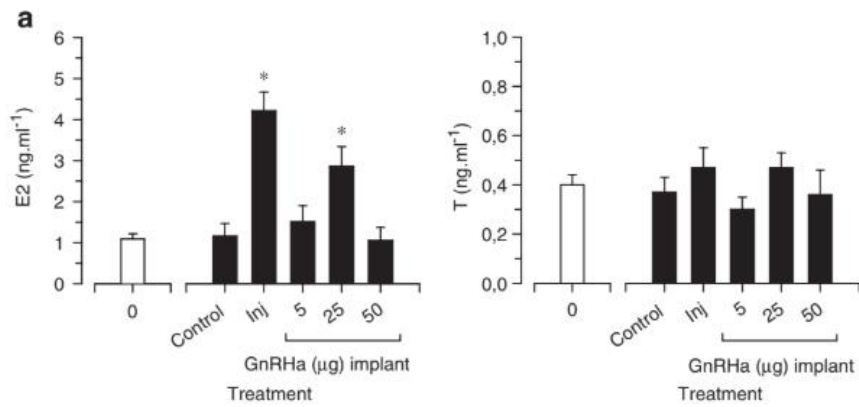


Figura 7. Niveles plasmáticos de E2, T en hembras. Tratamiento con inyecciones (5µg GnRH/kg) e implantes (5, 25, 50 µg GnRH/kg). Fuente: Agulleiro, 2006.

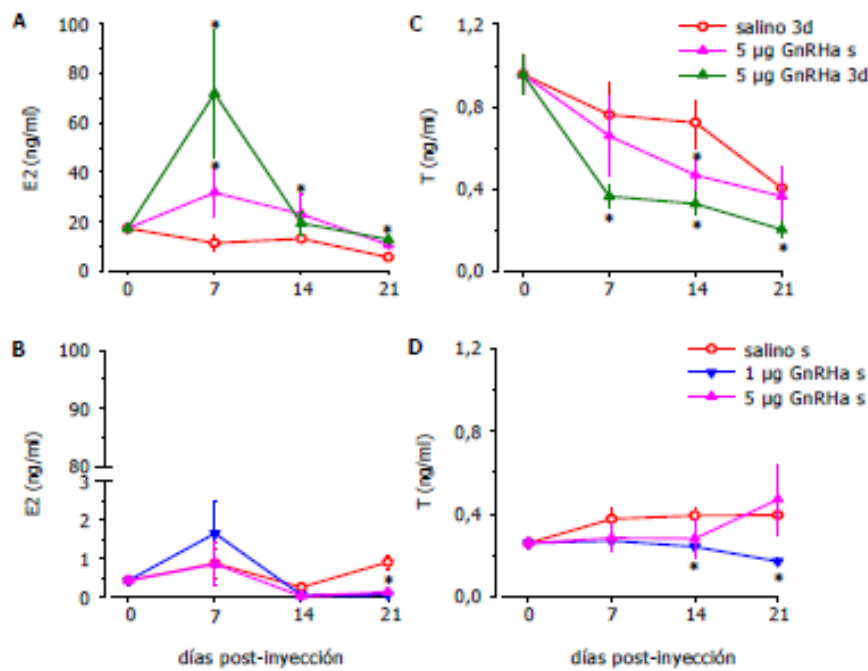


Figura 8. Niveles plasmáticos de E2 y T en hembras tratadas con inyecciones de GnRH. Primavera (A-C), otoño (B-D). Fuente: Gozalbo y Josep, 2008.

Para estimular la maduración del ovocito, la puesta y la secreción de esteroides, (Guzmán *et al.*, 2009) comparan la eficacia de dos sistemas de liberación sostenida con GnRH (implantes y microesferas) y la inyección de GnRH. Los resultados (figura 9) sugieren que las inyecciones con dosis de (5 o 25) µg /kg GnRH son eficaces para inducir la maduración. En cuanto a al tratamiento con implante, demostró

ser eficaz, no obstante se obtuvieron diferentes tamaños en los oocitos (600, 700 y 800 μm).

Asimismo, tanto los implantes como las microesferas resultaron ser eficaces para estimular el desove en el tanque, y al mismo tiempo, aumentar la producción de huevos. Los resultados sugieren que ambos sistemas de liberación sostenida son eficaces para inducir el desove y además, poseen la ventaja de que pueden aplicarse en hembras que no hayan alcanzado la maduración final de ovocito. No obstante, los desoves no estaban fertilizados.

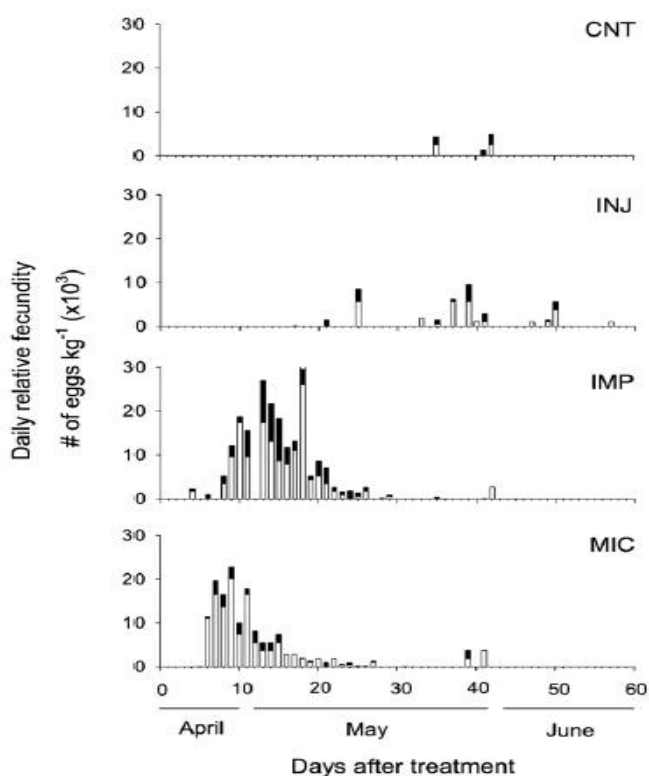


Figura 9. Fecundidad relativa después de varios tratamientos con: disolución salina (control, CNT), inyección con GnRH α (INJ) o microesferas (MIC). Las barras de color negro muestran la cantidad de huevos flotantes. Las barras de color blanco muestran los huevos no flotantes. Fuente: Guzmán *et al.*, 2009.

Los objetivos principales de los trabajos descritos anteriormente se basan en estimular la ovulación para obtener desoves de manera espontánea en el tanque a través de tratamientos hormonales (Figura 10), sin embargo hay otros autores como (Rasines *et al.*, 2012) que pretenden estimular la ovulación mediante tratamientos hormonales para la obtención de huevos por “stripping” y su posterior fecundación artificial.

Al igual que los otros autores, emplea los dos métodos de aplicación más comunes (inyección e implante) para estimular la ovulación y conocer las tasas de fecundación. Tras dos días de tratamiento con inyecciones de GnRHa, se consigue estimular el desove y al mismo tiempo incrementar el volumen de huevos sin afectar la calidad. No obstante, ambos tratamientos dieron lugar a bajas tasas de fecundación e incubación sin diferencias significativas entre ellas. Los mismos autores (Rasines *et al.*, 2013) vuelven a repetir el tratamiento, pero en este caso solo a través de inyecciones múltiples para inducir la ovulación y con la finalidad de determinar la hora adecuada para aplicar el tratamiento: en este caso se ensayó el tratamiento a las (6:00, 12:00 y 19:00). Los autores sugieren que se obtienen mejores resultados en calidad y cantidad de los huevos cuando el tratamiento se aplica temprano por la mañana, además de forma similar al estudio del año anterior, las tasas de eclosión fueron relativamente bajas comparándolas con el grupo control.

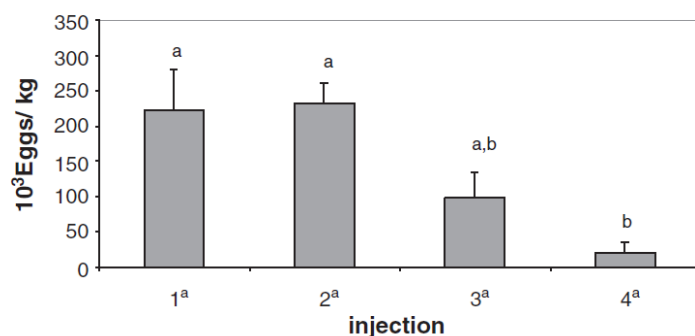


Figura 10. Fecundidad relativa observada después de aplicar inyecciones con GnRHa. Fuente: Rasines *et al.*, 2012.

○ **Tratamientos con antagonistas dopaminérgicos**

La posible existencia de una inhibición de la dopamina sobre la reproducción fue investigada en el lenguado senegalés en un estudio de (Guzmán *et al.*, 2011b). En este estudio, las hembras F1 fueron tratadas con pimozide, implantes GnRHa y el tratamiento combinado de GnRHa+ pimozide para observar los efectos provocados en el sistema endocrino y en el desove. Mientras que las hembras control no desovaron, las hembras tratadas con pimozide desovaron de manera espontánea (6 desoves, 12.000 huevos/kg), lo que indica el efecto estimulante del pimozide. El tratamiento con GnRHa indujo como se ha demostrado en varios estudios, el desove. La combinación de ambos tratamientos no modificó los efectos de la GnRHa en el desove y en la fecundidad total. Por otro lado, no menos importante, la calidad de los huevos se estudió a través del porcentaje de huevos flotantes y de la morfología, siendo los

resultados similares en todos los grupos tratados y a la de otros estudios, y una vez más, los desoves no fueron fertilizados.

- **Técnicas de estimulación de la espermatogénesis y la espermiación en machos**

Una de las disfunciones reproductivas en los machos F1 es la baja producción de esperma. Se han publicado varios estudios en los que los machos salvajes mantenidos en condiciones de cautividad producen aproximadamente 0,1 ml con un peso de alrededor de 1,5 kg, en cambio, se reduce a 0,04 ml en los machos F1. Es por esta razón por la cual varios estudios se han dedicado a estimular la espermatogénesis y la espermiación en los machos F1 de la especie *Solea senegalensis* (Mañanós *et al.*, 2019).

Varios estudios analizan el volumen del esperma obtenido por masaje y la calidad del mismo a través de parámetros como son la densidad y la movilidad. Además, se analizan otras variables como la histología de los testículos con el fin de determinar el grado de maduración de las gónadas, análisis moleculares para determinar la expresión génica, análisis de niveles plasmáticos para obtener información sobre la secreción de hormonas reproductivas y otras variables dirigidas a determinar la estimulación del proceso reproductivo (Mañanós *et al.*, 2019).

Los fármacos que se han empleado en los tratamientos hormonales se han probado en otras especies de teleósteos de los cuales destacan: GnRH α , antagonistas dopaminérgicos, esteroides sexuales, gonadotrofinas recombinantes y gonadotrofina coriónica humana.

En los siguientes apartados se describen y se discuten los diferentes tratamientos aplicados en los machos de la especie *Solea senegalensis*.

- **Tratamiento con GnRH α**

Es importante resaltar que el tratamiento a través de inyección intramuscular con GnRH α disuelto en solución salina no es normalmente recomendable para el tratamiento de machos, debido al desarrollo asíncrono de los testículos y al periodo prolongado de la espermiación. Por estas razones, se pretende una estimulación prolongada y sostenida de la espermiación, por lo que se han realizado varios estudios en los que determinan que el método de aplicación a través de inyecciones múltiples o implantes de liberación sostenida son más eficaces como se ha demostrado en varias especies de peces, incluyendo el lenguado senegalés (Mañanós *et al.*, 2008).

El trabajo de (Guzmán *et al.*, 2011a) compara la administración de GnRH α mediante inyecciones e implantes de liberación sostenida. Ambos tratamientos (Figura 11) incrementaron la secreción plasmática de T y 11-KT y la estimulación del tamaño de la gónada (GSI). Se demostró que solo los implantes estimularon la proliferación de células germinales y los estadios de maduración de las gónadas, posiblemente por la acción prolongada del implante (dos semanas posteriores al tratamiento), frente a las 24 horas de acción causados por la inyección. Desafortunadamente, el estudio no proporciona datos sobre la calidad y cantidad del esperma. Otro estudio de los mismos autores (Guzmán *et al.*, 2011b) confirma la capacidad de GnRH α en inducir la maduración testicular y la secreción de andrógenos y en este caso, en que sí miden parámetros espermáticos, se observa un incremento en el volumen de esperma tras el tratamiento con GnRH α , pero no en la producción total de espermatozoides. Cabe mencionar que, a pesar de la eficacia de los tratamientos con GnRH α en los machos, ninguno de los tratamientos fue exitoso en conseguir la obtención de puestas de huevos fecundados en los tanques experimentales.

De forma similar al estudio anterior, (Aguilleiro *et al.*, 2006) obtuvo una baja producción de espermatozoides después de aplicar el tratamiento con GnRH α , lo que podría ser una de las razones por la cual los óvulos no terminen fecundados. La baja producción de espermatozoides no se produce sólo en esta especie, es una disfunción común en otras especies de pleuronectiformes (Zohar y Mylonas, 2001).

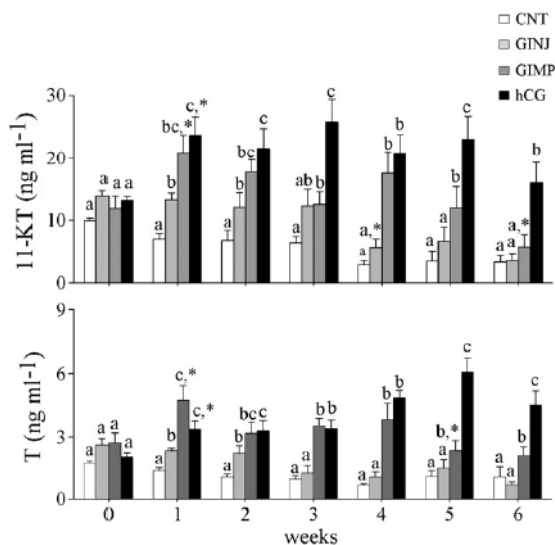


Figura 11. Niveles plasmáticos de T y 11-KT en machos tratados con: grupo control (CNT), inyecciones con GnRH α (GINJ), implantes (GIMP) o inyecciones de hCG (hCG). Fuente: Guzmán *et al.*, 2009.

○ **Progestina 17 α ,20 β -DHP**

El esteroide que se encarga de regular la maduración final de los espermatozoides, hidratación del esperma en machos y la maduración de los oocitos en hembras de varias especies de teleósteos es la progestina 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17 α , 20 β -DHP) (Asturiano *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2010).

Solo hay un estudio en lenguado senegalés (Figura 12), que investiga la posible acción estimuladora de tratamientos con progestina (Cabrita *et al.*, 2011).

El estudio demuestra que el tratamiento aplicado en las hembras del mismo tanque, estimula la viabilidad, la velocidad y la motilidad del esperma en los machos circundantes, lo que sugiere que hay comunicación entre ambos sexos y que ésta influye de manera significativa en el sistema endocrino masculino y en regulación de la producción y la calidad de los espermatozoides.

Este hallazgo sobre la comunicación feromonal entre congéneres también se postula en el trabajo de (Guzmán *et al.*, 2011), en el que realiza un estudio comparativo de tratamientos hormonales en machos y observan mayores tasas de ovulación en los tanques de machos tratados (GnRHa o hCG) que en los tanques de machos no tratados, sugiriendo que la inducción hormonal de los machos provocaba a su vez una estimulación indirecta (probablemente vía feromonal) de la puesta de huevos en las hembras circundantes.

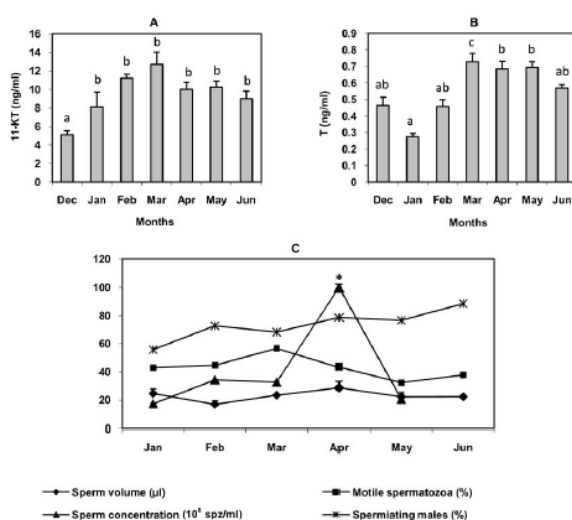


Figura 12. Niveles plasmáticos en los diferentes meses de 11-KT (A) y T (B). Volumen, concentración de esperma y motilidad de los espermatozoides en los diferentes meses (C). Fuente: Cabrita *et al.*, 2011.

La comunicación feromonal entre congéneres es algo conocido y estudiado en algunas especies de teleósteos, los cuales son capaces de liberar al medio esteroides sexuales que ejercen un efecto en la fisiología reproductiva y en el comportamiento reproductivo de sus congéneres (Munakata y Kobayashi, 2010). Por ejemplo, en el pez cebra (*Brachydanio rerio*) (Lambert *et al.*, 1986), arenque del Pacífico (*Clupea pallasii*) (Carolsfeld *et al.*, 1997) y en el pez dorado (*Carassius auratus*) (Sorensen *et al.*, 2005) se han utilizado las feromonas producidas por los machos para inducir la ovulación y el desove en las hembras.

- **Tratamiento con hormona coriónica humana (hCG)**

En humanos, una de las hormonas glicoprotéicas sintetizadas durante la gestación es la hCG. Esta hormona se encarga de que el cuerpo lúteo del ovario no se desintegre de tal manera que regula la producción de progesterona. Esta hormona, estructuralmente similar a la LH, se ha utilizado como terapia hormonal desde hace décadas en el ámbito clínico y veterinario, así como posteriormente en acuicultura. El tratamiento con inyecciones de hCG ha demostrado ser eficaz en varias especies de teleósteos que presentan problemas reproductivos en cautividad (Harvey y Hoar, 1980).

La hCG actúa directamente sobre la gónada e induce la maduración de las gónadas, desove en hembras y la espermiación en machos. Una de las desventajas de la aplicación del tratamiento es la inmunorreacción que puede causarle al pez tratado, pudiendo producirse una disminución significativa del efecto de la hormona en tratamientos repetitivos (Patino, 1997). Los tratamientos basados en hCG se aplican normalmente a través de inyecciones sucesivas (separadas en varios días) con dosis en el rango de 100-4000 IU/kg (Ohta y Tanaka, 1997).

En el trabajo de (Guzmán *et al.*, 2011) se describen los efectos de inyecciones de hCG a una dosis de 1000 IU /Kg. La dosis empleada (Figura 13) ha estimulado la espermatogénesis y la secreción de andrógenos (11-KT y T). También se observa la existencia de un desove fertilizado en el tanque de reproductores en que los machos se trataron con hCG, aunque es positivo el resultado, no puede considerarse como definitivo para justificar la idoneidad del tratamiento con hCG adecuado para resolver el problema de fertilización en los F1, por lo que se requiere seguir investigando en éste ámbito.

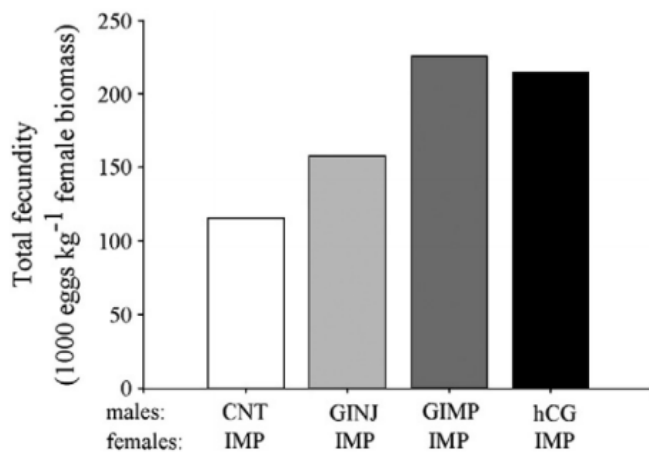


Figura 13. Fecundidad total. Los tratamientos han sido los siguientes: control (CNT), inyecciones de GnRH α (GINJ), implantes GnRH α (GIMP) o inyecciones múltiples de hCG (hCG). Fuente: Guzmán *et al.*, 2011.

Otro estudio realizado por (Pankhurst y Poortenaar, 2000) compara la efectividad a nivel endocrino mediante inyecciones con hCG e inyecciones con GnRH α en la platija dorada (*Rhombosolea tapirina*). El tratamiento con hCG a una concentración de 1000 IU/Kg incrementó la secreción de andrógenos (T y 11-KT) en comparación con 100 μ g/Kg de GnRH α . Sin embargo, las dobles inyecciones con hCG no han dado resultados significativos en la secreción de andrógenos en el pleuronectiforme pez gallo (*Limanda limanda*), sugiriendo que se debe posiblemente a la baja dosis de la hormona. Al contrario, en el estudio de (Peñaranda *et al.*, 2010), múltiples inyecciones con una concentración de 1500 IU/Kg de hCG han estimulado la secreción del andrógeno 11-KT en la anguila europea (*Anguilla anguilla*).

○ Tratamiento con antagonistas dopaminérgicos

Existe una doble regulación neuroendocrina encargada sobre la secreción de gonadotrofinas hipofisarias, principalmente por las neuronas GnRH y otra inhibidora, como inhibidores, principalmente por las neuronas dopaminérgicas. Dependiendo de la potencia en la que actúa el sistema inhibitor dopaminérgico de la especie, los tratamientos con GnRH α pueden requerir o no la administración conjunta de un antagonista dopaminérgico capaz de inhibir el sistema inhibitor endógeno de la especie y permitir la acción estimuladora del tratamiento con GnRH α .

Los fármacos antidopaminérgicos más utilizados son el: pimozide y la domperidona. La inhibición dopaminérgica es particularmente importante en peces de agua dulce como los ciprínidos, entre los cuales se encuentran diversas especies de carpas de

gran importancia para el cultivo en países asiáticos (Carrillo y Zanuy, 1993; De Acuicultura, 2009).

(Guzmán *et al.*, 2011b) fueron los primeros en demostrar el potencial de los efectos inhibitorios de la dopamina en la regulación del eje reproductivo en el lenguado senegalés basándose en estudios con otras especies de teleósteos. El estudio determina la efectividad del pimozide administrado sólo (3 inyecciones con 5 mg/kg) o en combinación con GnRH α (implante EVAc cargado con 40 μ g/kg). El estudio demuestra que el tratamiento con pimozide estimula la espermatogénesis (aumenta el número de quistes con espermatogonias en el testículo), la maduración testicular (aumenta el número de espermatozoides) y la producción de esperma (aumento del volumen de esperma), además de la secreción de andrógenos (Figura 14), lo que demostraría la presencia de un tono inhibitorio de la dopamina en el lenguado senegalés, que potencialmente puede activarse y jugar un papel importante en la regulación reproductiva. Además se observó que el tratamiento combinado incrementó el volumen de esperma respecto al resto de tratamientos como se puede observar en la figura 15.

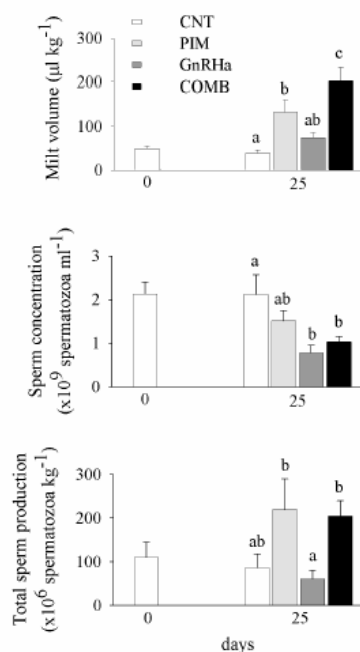


Figura 14. Volumen, concentración y producción total de esperma en machos tratados con pimozide (PIM), GnRH α y la combinación de ambos tratamientos. Fuente: Guzmán *et al.*, 2011b.

A nivel endocrino, ninguno de los tratamientos modificó el contenido de GnRHs en la pituitaria ni la expresión génica de las gonadotropinas ($fsh\beta$ y $lh\beta$), no obstante los tratamientos con GnRHa y pimozide incrementaron la secreción de T y 11-KT. Los autores observan una ausencia del efecto del pimozide sobre la cantidad de GnRH en el cerebro, lo que según los autores podría ser debido a que la dopamina no afecta a la liberación de GnRH en las terminaciones nerviosas y por ende, se acumula en la hipófisis. Por otro lado, los niveles de T y 11-KT disminuyeron cuando se les aplicó el tratamiento combinado, lo que podría estar asociado a una estimulación del estado de maduración gonadal en estos individuos. Las etapas avanzadas de maduración gonadal se asocian con un cambio en las vías esteroidogénicas reduciéndose la síntesis de andrógenos y aumentando la producción de progestágenos (Vermeirssen *et al.*, 2000).

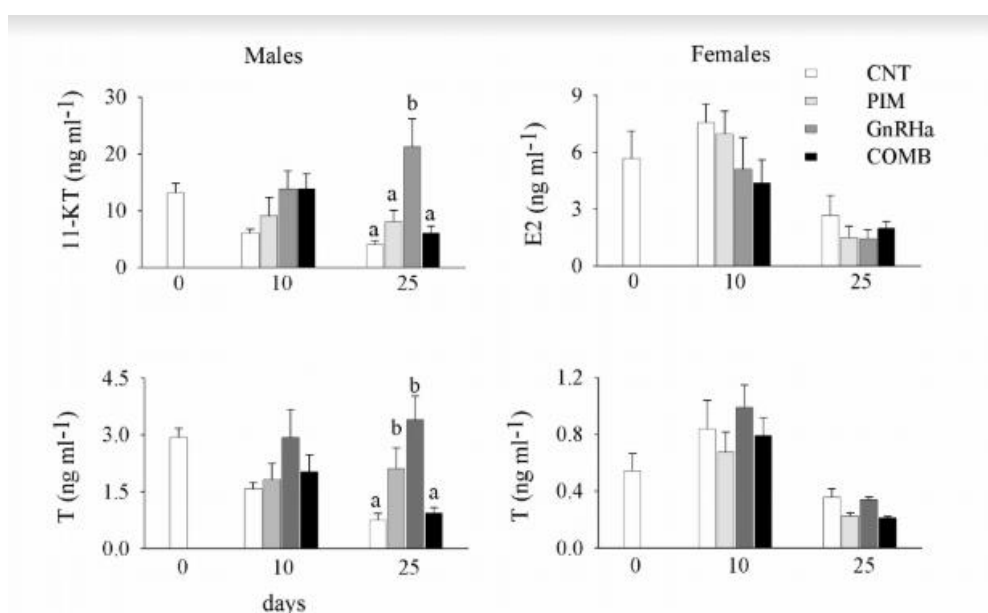


Figura 15. Niveles plasmáticos de T y 11-KT en machos y niveles de E2 y T en hembras. Los tratamientos aplicados son pimozide (PIM), GnRHa y la combinación de ambos. Fuente: Guzmán *et al.*, 2011b.

○ Hormonas recombinantes

Existen varios sistemas de expresión de hormonas recombinantes (Melamed *et al.*, 2002), destacando los basados en células de insectos (Lin *et al.*, 2002), levaduras (Yodmuang *et al.*, 2004), bacterias (Villacis *et al.*, 2004) y mamíferos. Actualmente los tipos celulares que se emplean en mamíferos derivan de humanos, ratones o hámsteres (Román, 2018).

Las gonadotropinas recombinantes de teleósteos producidas en células derivadas del ovario de hámster chino (CHO) han demostrado ser más estables y bioactivas “in vivo” que las hormonas producidas en otros sistemas (Molés *et al.*, 2011). Esto puede deberse a la capacidad de las células de los mamíferos para expresar glicoproteínas con oligosacáridos complejos (Kost *et al.*, 2005; Molés *et al.*, 2011). Las células CHO pueden fabricar rFSHsc y rLHsc de lenguado glicosiladas y a su vez activar los receptores específicos.

La rLhsc es capaz de activar el receptor de FSH de lenguado, pero con menor potencia que la rFshsc, de forma similar a lo observado en otros estudios (Chauvigne *et al.*, 2010). Esto sugiere que el receptor de la hormona luteinizante (Lhcgr) se activa con la rFshsc a pesar de que debería de confirmarse empleando dosis controladas de rFshsc. En conjunto, estos resultados indican que las células CHO son aptas para producir gonadotropinas recombinantes de lenguado senegalés (Verdura *et al.*, 2011).

Los mismos autores en otro estudio (Verdura *et al.*, 2011) demuestran que estas hormonas promueven de manera eficaz la espermatogénesis y la producción de esperma en los machos de lenguado F1. Los resultados del estudio han demostrado que el tratamiento con rFSH “en vivo” en el lenguado senegalés, puede estimular el crecimiento de las gónadas y las primeras etapas de la espermatogénesis, incluida la proliferación de espermatogonias y la entrada a la meiosis, mientras que la aplicación de rLH potencia la diferenciación de espermatozoides y la acumulación en los conductos testiculares. En este estudio también muestran con una gran variabilidad de respuestas entre ejemplares, como se ha demostrado en el trabajo de (Chauvigne *et al.*, 2017). Sin embargo, también se ha observado que la administración del tratamiento con altas dosis durante el desove, puede ser perjudicial para los testículos y afectar la supervivencia de las células de Leydig y su función esteroideogénica, lo que causaría una reducción del esperma.

Los mismos autores (Chauvigné *et al.*, 2018) determinan posteriormente que los resultados dependen de la etapa reproductiva de los machos que probablemente esté determinada por las condiciones de temperatura y fotoperiodo, las dosis de rFSH y rLH aplicadas, y posiblemente, por la temperatura durante la cual se producen la espermiogénesis y la espermiación inducida por rLH. La conclusión de que rFSH no fue eficaz a temperaturas más altas puede coincidir con la observación de que las temperaturas invernales más elevadas, pueden afectar a la producción de esperma y al desove en el lenguado senegalés (Aguilleiro *et al.*, 2007).

En el trabajo de (Chauvigne *et al.*, 2017) se realizó un segundo estudio empleando ambas hormonas, en que se probó el efecto de las inyecciones repetidas de rLH en la calidad y cantidad del esperma producido por los machos tratados con rFSH durante 4-10 semanas (Figura 16). Los resultados sugirieron que la combinación de ambos tratamientos podría aumentar la espermatogénesis hasta 7 veces y mejorar la motilidad de los espermatozoides. Tras a la aplicación de rLH, los niveles plasmáticos de 11-KT se vieron modificados de manera dependiente a la dosis de rFSH, relacionado con la proliferación de las células de Leydig y por lo tanto influenciando la potencia esteroidogénica.

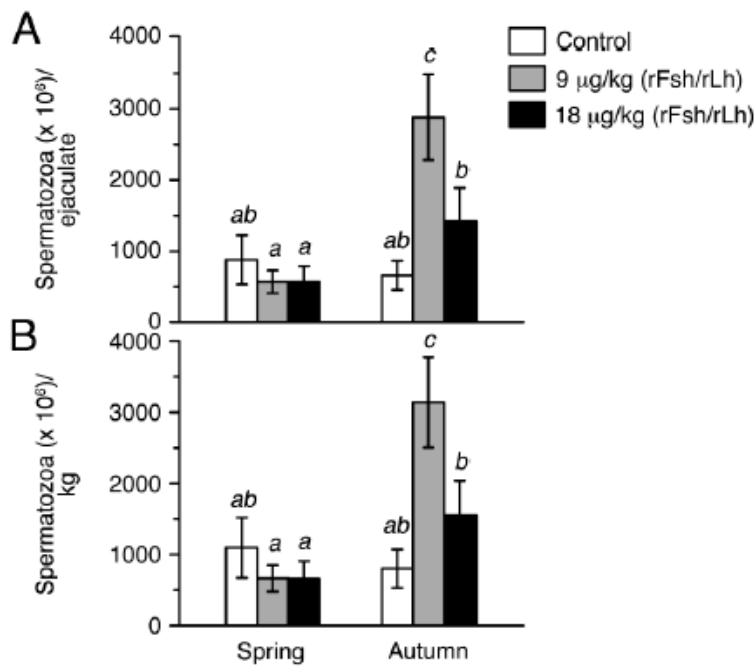


Figura 16. Producción de esperma en machos tratados con rLH y rFSH con diferentes dosis durante primavera y otoño. Fuente: Chauvigne *et al.*, 2017.

Es importante destacar que se han obtenido resultados similares en otras especies de peces, en los que destaca el pez rey de cola amarilla (*Seriola lalandi*), el cual reduce la secreción de 11-KT en los machos con pubertad temprana debido a la acción de la rFSH y el esturión (*Acipenser gueldenstaedtii*), en el cual mediante ensayos “in vitro” con elevadas dosis de rFSH reducen la secreción de 11-kT. Estos resultados sugieren que las bajas dosis son más efectivas que las altas (Yom-Din *et al.*, 2016).

En este sentido, todavía se necesitan más estudios para establecer las condiciones óptimas para inducir la espermatogénesis a través de hormonas recombinantes.

- **Implante 11-ketoandrostenediona (OA)**

La 11-Ketoandrostenediona es un precursor inmediato en la biosíntesis del andrógeno 11-KT. Mediante la conversión causada por la enzima 17 β hidroxisteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), presente en los testículos y en otros tejidos de peces (Mayer *et al.*, 1990a; Schulz y Blüm, 1991). En los mamíferos (hombre y rata), la reducción de la androstenediona a testosterona es catalizada por la enzima 17 β -HSD tipo 3, y recientemente se ha demostrado que la OA es un sustrato no sólo del pez cebra sino también de humano 17 β -HSD tipo 3 (Mindnich *et al.*, 2005).

En el lenguado senegalés solo se ha publicado un artículo dirigido a estudiar la acción de la OA solo y en combinación con GnRHa (Agulleiro *et al.*, 2007). En este trabajo se demostró que la combinación de ambos (GnRHa + OA) estimula la espermatogénesis y la movilidad del esperma. No obstante, las altas dosis de OA afectaron a la producción espermática, reduciendo la cantidad al octavo día del tratamiento aplicado en machos. Por otro lado, el tratamiento provocó un aumento en la movilidad de los espermatozoides. Los resultados (Figura 17) indican que la aceleración de la espermatogénesis viene asociada a la producción de espermatozoides con mayor movilidad y por ende, por la producción de esteroides como las progestinas o esteroides C₂₁ (pregnenolona, 17 α -hidropregnenolona, progesterona, 17 α hidroprogesterona, 17 α -hidroxi-20 β -dihidroxiprogesterona o DPH), candidatos más probables en inducir la producción de esperma (Thomas, 2000; Miura, 2003). La producción de espermatozoides con mayor movilidad también se postula en el trabajo de (Pérez *et al.*, 2000), en el que se realiza un estudio en la anguila europea (*Anguilla anguilla*) y se observa un aumento progresivo en la movilidad de los espermatozoides tras la aplicación de hCG.

Table 2
Effect of GnRH α (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) with or without OA on milt production and sperm motility in the Senegalese sole

	Saline	GnRH α +OA (mg kg $^{-1}$)		
		0	2	7
<i>n</i>	6	6	4	6
Spermiating males	6	6	4	5
Testis wet weight (g)	0.33 \pm 0.01	0.32 \pm 0.03	0.29 \pm 0.06	0.26 \pm 0.04
Milt volume ($\mu\text{l g}^{-1}$ testis wet weight)	13.1 \pm 2.4 ^a	33.1 \pm 5.5 ^b	40.1 \pm 14 ^b	11.1 \pm 3.1 ^a
SD ($\times 10^9 \text{ ml}^{-1}$)	4.6 \pm 1.2	2.8 \pm 0.6	3.5 \pm 1.9	2.3 \pm 1.5
SMD (s)	241 \pm 29 ^a	232 \pm 14 ^a	450 \pm 53 ^b	486 \pm 51 ^b

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

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

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

Figura 17. Efectos de los tratamientos con 50 $\mu\text{g/kg}$ de GnRH α con o sin OA en la producción y motilidad del esperma del lenguado senegalés. Fuente: Agulleiro *et al.*, 2007.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Fin de Grado, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los tratamientos que estimulan la ovulación y el desove en las hembras F1 de la especie *Solea senegalensis* sin afectar a la calidad de los huevos son los basados en GnRH α .
- El principal problema reproductivo del lenguado senegalés F1, es la ausencia total del desove fertilizado en el tanque. Esto se debe a la ausencia del comportamiento reproductivo. Es cierto que los tratamientos hormonales son eficaces en inducir la puesta de huevos en reproductores F1, como se ha descrito en el trabajo de fin de grado, pero son ineficaces para estimular el comportamiento reproductivo y por lo tanto, la fecundación de los huevos.
- Los tratamientos que estimulan la espermatogénesis y la producción de esperma en los machos de la especie *Solea senegalensis* sin afectar la calidad son aquellos basados en gonadotropinas recombinantes y hCG, implantes de GnRH α y combinados con precursores de 11-Ketoandrostenediona y antagonistas de la dopamina como la pimozide.

7. LÍNEAS FUTURAS

- Diseño de protocolos ambientales y hormonales que estimulen el comportamiento reproductivo.
- Estudios dirigidos a determinar la posible acción de mecanismos epigenéticos en la disfunción reproductiva de los individuos cultivados (generación F1).

8. BIBLIOGRAFÍA

- 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(1-4), 511-524.
- Agulleiro, M. J., Scott, A. P., Duncan, N., Mylonas, C. C., & Cerdà, J. (2007). Treatment of GnRHa-implanted Senegalese sole (*Solea senegalensis*) with 11-ketoandrostenedione stimulates spermatogenesis and increases sperm motility. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147(4), 885-892.
- APROMAR. (2019). La acuicultura en España 2019. Consultado el día 14/4/20 en (<http://apromar.es/sites/default/files/2019/InformeAcui/APROMAR%20Informe%20ACUICULTURA%202019%20v-1-2.pdf>).
- Arabacı, M., Çağırğan, H., & Sarı, M. (2004). Induction of ovulation in ornamental common carp (Koi, *Cyprinus carpio* L.) using LHRHa ([d-Ser (tBu) 6, Pro9-NEt]-LHRH) combined with haloperidol and carp pituitary extract. *Aquaculture Research*, 35(1), 10-14.
- Arias, A. M., & Drake, P. (1990). Estados juveniles de la ictiofauna en los caños de las salinas de la Bahía de Cádiz: CSIC-Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN).
- Asturiano, J. F., Sorbera, L. A., Ramos, J., Kime, D. E., Carrillo, M., & Zanuy, S. (2002). Group-synchronous ovarian development, spawning and spermiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenesis. *Scientia Marina*, 66(3), 273-282.
- Bayarri, M. J., Muñoz-Cueto, J. A., López-Olmeda, J. F., Vera, L. M., De Lama, M. R., Madrid, J. A., & Sanchez-Vazquez, F. J. (2004). Daily locomotor activity and melatonin rhythms in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Physiology & behavior*, 81(4), 577-583.
- Ben-Tuvia, A. (1990). A taxonomic reappraisal of the Atlanto-Mediterranean soles *Solea solea*, *S. senegalensis* and *S. lascaris*. *Journal of Fish Biology*, 36(6), 947-960.
- Brown, L., Muñoz, C., Siemer, L., Edelman, E., & Langer, R. (1986). Controlled release of insulin from polymer matrices: control of diabetes in rats. *Diabetes*, 35(6), 692-697.

- Cabrita, E., Robles, V., & Herráez, P. (2008). *Methods in reproductive aquaculture: marine and freshwater species*: CRC press.
- Cabrita, E., Soares, F., Beirão, J., García-López, A., Martínez-Rodríguez, G., & Dinis, M. (2011). Endocrine and milt response of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, males maintained in captivity. *Theriogenology*, 75(1), 1-9.
- Calvo, A., Gil, J., Moure, M., Álvarez, C., Cañavate, J., & Anguís, V. (2005). Primeros resultados de puestas naturales obtenidas en reproductores de primera generación (F1) de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Paper presented at the Proceedings of X Congreso Nacional de Acuicultura. Universidad Politécnica de Valencia, Gandía, Spain.
- Canavate, J. P., & Fernández-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(3-4), 255-263.
- Cañavate, J. (2011). Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 para diversificar la acuicultura marina. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía*, 21(1-4), 147-154.
- Cañavate, J. P. (2005). Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 para diversificar la acuicultura marina. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía*, 21(1), 147-154.
- Carazo Ortega, I. (2013). Comportamiento reproductivo y fisiología del lenguado senegalés, (*Solea Senegalensis*) en cautividad/Reproductive Behaviour and Physiology of Senegalese Sole, (*Solea Senegalensis*) Broodstock in Captivity.
- Carolsfeld, J., Scott, A., & Sherwood, N. (1997). Pheromone-induced spawning of Pacific herring. *Hormones and Behavior*, 31(3), 269-276.
- Carolsfeld, J., Sherwood, N. M., Kreiberg, H., & Sower, S. A. (1988). Induced sexual maturation of herring using GnRH 'quick-release' cholesterol pellets. *Aquaculture*, 70(1-2), 169-181.
- Carrillo, M., & Zanuy, S. (1993). Fisiología de la reproducción: Fisiología de la reproducción de los Teleósteos. *Acuicultura Marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*, (Coordinación de F. Castello Orvay), 125-142.
- Chauvigné, F., González, W., Ramos, S., Ducat, C., Duncan, N., Giménez, I., & Cerdà, J. (2018). Seasonal-and dose-dependent effects of recombinant gonadotropins on sperm production and quality in the flatfish *Solea senegalensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 225, 59-64.

- Chauvigne, F., Olle, J., Gonzalez, W., Duncan, N., Gimenez, I., & Cerda, J. (2017). Toward developing recombinant gonadotropin-based hormone therapies for increasing fertility in the flatfish Senegalese sole. *PLoS one*, 12(3).
- Chauvigné, F., Tingaud-Sequeira, A., Agulleiro, M. J., Calusinska, M., Gómez, A., Finn, R. N., & Cerda, J. (2010). Functional and evolutionary analysis of flatfish gonadotropin receptors reveals cladal-and lineage-level divergence of the teleost glycoprotein receptor family. *Biology of reproduction*, 82(6), 1088-1102.
- De Acuicultura, F. O. E. (2009). REPRODUCCION EN PECES ASPECTOS BASICOS Y SUS APLICACIONES: Editorial Paraninfo.
- Devauchelle, N., Alexandre, J., Le Corre, N., & Letty, Y. (1987). Spawning of sole (*Solea solea*) in captivity. *Aquaculture*, 66(2), 125-147.
- Devauchelle, N., Alexandre, J., Le Corre, N., & Letty, Y. (1988). Spawning of turbot (*Scophthalmus maximus*) in captivity. *Aquaculture*, 69(1-2), 159-184.
- Dinis, M. T., Ribeiro, L., Soares, F., & Sarasquete, C. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*, 176(1-2), 27-38.
- Dinis, T., & Ribeiro, L. (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*, 176(1-2), 27-38.
- Engrola, S., Figueira, L., Conceição, L. E., Gavaia, P. J., Ribeiro, L., & Dinis, M. T. (2009). Co-feeding in Senegalese sole larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. *Aquaculture*, 288(3-4), 264-272.
- FAO. (2020). Fisheries and Aquaculture. Species Fact Sheets: *Solea solea* (Quensel,1806).FAO,Roma.Consultado el día 14/4/20 en (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Solea_spp/en).
- Fernández-Díaz, C., Yýfera, M., Cañavate, J., Moyano, F., Alarcón, F., & Díaz, M. (2001). Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Journal of Fish Biology*, 58(4), 1086-1097.
- Fernández, I., Pimentel, M. S., Ortiz-Delgado, J. B., Hontoria, F., Sarasquete, C., Estévez, A., Gisbert, E. (2009). Effect of dietary vitamin A on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. *Aquaculture*, 295(3-4), 250-265.
- Gozalbo, A., & Josep, M. (2008). Fisiología de la reproducción del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*): mecanismos endocrinos y aplicaciones en acuicultura: Universitat de València.
- Guzmán, J. M., Cal, R., García-López, Á., Chereguini, O., Kight, K., Olmedo, M., . . . Zohar, Y. (2011b). Effects of in vivo treatment with the dopamine antagonist pimozide and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) on the

- reproductive axis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 158(2), 235-245.
- Guzmán, J. M., Mañanós, E. L., Ramos, J., & Mylonas, C. C. (2011a). Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) treatments on the stimulation of male Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reproduction. *Aquaculture*, 316(1-4), 121-128.
- Guzmán, J. M., Norberg, B., Ramos, J., Mylonas, C. C., & Mañanós, E. L. (2008). Vitellogenin, steroid plasma levels and spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *General and comparative endocrinology*, 156(2), 285-297.
- Guzmán, J. M., Ramos, J., Mylonas, C. C., & Mañanós, E. L. (2009). Spawning performance and plasma levels of GnRHa and sex steroids in cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*) treated with different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture*, 291(3-4), 200-209.
- Guzmán, J. M., Ramos, J., Mylonas, C. C., & Mañanós, E. L. (2011). Comparative effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) treatments on the stimulation of male Senegalese sole (*Solea senegalensis*) reproduction. *Aquaculture*, 316(1-4), 121-128.
- Guzmán, J. M., Rubio, M., Ortiz-Delgado, J. B., Klenke, U., Kight, K., Cross, I., . . . Sarasquete, C. (2009). Comparative gene expression of gonadotropins (FSH and LH) and peptide levels of gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) in the pituitary of wild and cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstocks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 153(3), 266-277.
- Harvey, B. J., & Hoar, W. S. (1980). *Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces*: CIID, Ottawa, ON, CA.
- Holmefjord, I., Gulbrandsen, J., Lein, I., Refstie, T., Léger, P., Huse, I., . . . Bolla, S. (1993). An intensive approach to Atlantic halibut fry production. *Journal of the World Aquaculture Society*, 24(2), 275-284.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., & Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology*, 23(5), 567-575.
- Lambert, J., Van Den Hurk, R., Schoonen, W., Resink, J., & Van Oordt, P. (1986). Gonadal steroidogenesis and the possible role of steroid glucuronides as sex pheromones in two species of teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2(1-4), 101-107.

- Levavi-Sivan, B., Bogerd, J., Mañanós, E. L., Gómez, A., & Lareyre, J. J. (2010). Perspectives on fish gonadotropins and their receptors. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 412-437.
- Lin, S.-T., Chang, Y.-S., Wang, H.-C., Tzeng, H.-F., Chang, Z.-F., Lin, J.-Y., . . . Kou, G.-H. (2002). Ribonucleotide reductase of shrimp white spot syndrome virus (WSSV): expression and enzymatic activity in a baculovirus/insect cell system and WSSV-infected shrimp. *Virology*, 304(2), 282-290.
- López, J. M. A., & Reiriz, C. S. (2005). Atlas histológico del lenguado senegalés," *Solea senegalensis*"(Kaup, 1858) (Vol. 18): Editorial CSIC-CSIC Press.
- Mañanós, E., Duncan, N., & Mylonas, C. (2008). Reproduction and control of ovulation, spermiation and spawning in cultured fish. *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, 3-80.
- Mañanós, E. L., Duncan, N., Reiriz, C. S., López, A. G., Guzmán, J. M., & Cueto, J. A. M. (2019). Reproductive Physiology and Broodstock Management of Soles. *The Biology of Sole*, 90.
- Mañanós, E. L., Duncan, N., Reiriz, C. S., López, A. G., Guzmán, J. M., & Cueto, J. A. M. (2019). Reproductive Physiology and Broodstock Management of Soles. *The Biology of Sole*, 90.
- Melamed, P., Gong, Z., Fletcher, G., & Hew, C. L. (2002). The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. *Aquaculture*, 204(3-4), 255-269.
- Mindnich, R., Haller, F., Halbach, F., Moeller, G., De Angelis, M. H., & Adamski, J. (2005). Androgen metabolism via 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 3 in mammalian and non-mammalian vertebrates: comparison of the human and the zebrafish enzyme. *Journal of molecular endocrinology*, 35(2), 305.
- Miura, T., & Miura, C. I. (2003). Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1-4), 181-186.
- Molés, G., Zanuy, S., Muñoz, I., Crespo, B., Martínez, I., Mañanós, E., & Gómez, A. (2011). Receptor specificity and functional comparison of recombinant sea bass (*Dicentrarchus labrax*) gonadotropins (Fsh and Lh) produced in different host systems. *Biology of reproduction*, 84(6), 1171-1181.
- Munakata, A., & Kobayashi, M. (2010). Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 456-468.
- Mylonas, C. C., Fostier, A., & Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 516-534.

- Nagahama, Y., & Yamashita, M. (2008). Regulation of oocyte maturation in fish. *Development, growth & differentiation*, 50, S195-S219.
- Navas Porras, F. M. (2017). Efecto de la incorporación de selenio a través de la dieta (rotíferos, *Brachiounus plicatilis*) en el desarrollo larvario de lenguado (*Solea senegalensis*, Kaup 1858).
- Norberg, B., Brown, C. L., Halldorsson, O., Stensland, K., & Björnsson, B. T. (2004). Photoperiod regulates the timing of sexual maturation, spawning, sex steroid and thyroid hormone profiles in the Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 229(1-4), 451-467.
- Ohta, H., & Tanaka, H. (1997). Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 153(1-2), 123-134.
- Okada, H., Doken, Y., Ogawa, Y., & Toguchi, H. (1994). Preparation of three-month depot injectable microspheres of leuprorelin acetate using biodegradable polymers. *Pharmaceutical research*, 11(8), 1143-1147.
- Pankhurst, N., & Poortenaar, C. (2000). Milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder *Rhombosolea tapirina* following treatment with exogenous hormones. *Marine & Freshwater Behaviour & Phy*, 33(3), 141-159.
- Patino, R. (1997). Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals. *The Progressive Fish-Culturist*, 59(2), 118-128.
- Peñaranda, D. S., Pérez, L., Gallego, V., Jover, M., Tveiten, H., Baloché, S., Asturiano, J. F. (2010). Molecular and physiological study of the artificial maturation process in European eel males: from brain to testis. *General and comparative endocrinology*, 166(1), 160-171.
- Pérez, L., Asturiano, J., Tomás, A., Zegrari, S., Barrera, R., Espinós, F., . . . Jover, M. (2000). Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. *Journal of Fish Biology*, 57(6), 1488-1504.
- Rasines, I., Gómez, M., Martín, I., Rodríguez, C., Mañanós, E., & Chereguini, O. (2012). Artificial fertilization of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Hormone therapy administration methods, timing of ovulation and viability of eggs retained in the ovarian cavity. *Aquaculture*, 326, 129-135.
- Rasines, I., Gómez, M., Martín, I., Rodríguez, C., Mañanós, E., & Chereguini, O. (2013). Artificial fertilisation of cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*):

- effects of the time of day of hormonal treatment on inducing ovulation. *Aquaculture*, 392, 94-97.
- Rasines Pérez, I. (2013). Reproducción en cautividad del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*): inducción hormonal a la ovulación y obtención de huevos para la fecundación artificial.
- Román Roldán, R. (2018). Desarrollo de procesos de producción de proteínas bioterapéuticas: aumento de la productividad específica en células HEK293.
- Scott, A., Sumpter, J., & Stacey, N. (2010). The role of the maturation-inducing steroid, 17, 20 β -dihydroxypregn-4-en-3-one, in male fishes: a review. *Journal of Fish Biology*, 76(1), 183-224.
- Schulz, R., & Blüm, V. (1991). Extragonadal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in rainbow trout. *General and comparative endocrinology*, 82(2), 197-205.
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J.-J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 390-411.
- Sorensen, P., Pinillos, M., & Scott, A. (2005). Sexually mature male goldfish release large quantities of androstenedione into the water where it functions as a pheromone. *General and comparative endocrinology*, 140(3), 164-175.
- Swanson, P., Dickey, J. T., & Campbell, B. (2003). Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28(1-4), 53-59.
- Thomas, P. (2000). Nuclear and membrane steroid receptors and their functions in teleost gonads. Paper presented at the International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish.
- Tokarz, J., Möller, G., de Angelis, M. H., & Adamski, J. (2015). Steroids in teleost fishes: a functional point of view. *Steroids*, 103, 123-144.
- Tsujigado, A., Yamakawa, T., Matsuda, H., & Kamiya, N. (1987). Advanced spawning of the flounder, *Paralichthys olivaceus*, in an indoor tank with combined manipulation of water temperature and photoperiod. *Bulletin of the Fisheries Research Institute of Mie (Japan)*.
- Verdura, S., Chauvigné, F., Mazón, M. J., Zanuy, S., Gómez, A., & Cerdà, J. (2011). Producción de gonadotropinas recombinantes de lenguado Senegalés (*Solea senegalensis*) para el control de la reproducción.
- Vermeirssen, E. L., Shields, R., De Quero, C. M., & Scott, A. (2000). Gonadotrophin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 22(1), 77-87.

- Villacis, J., Lehrer, N., Vogel, L., Schicktanz, S., Randow, S., Reese, G., . . . Lehrer, S. (2004). Comparison of IgE reactivity of recombinant and natural pen a 1 by RAST and mediator release. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113(2), S148.
- Weltzien, F.-A., Andersson, E., Andersen, Ø., Shalchian-Tabrizi, K., & Norberg, B. (2004). The brain–pituitary–gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 137(3), 447-477.
- Yaron, Z. (1995). Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, 129(1-4), 49-73.
- Yodmuang, S., Udomkit, A., Treeratrakool, S., & Panyim, S. (2004). Molecular and biological characterization of molt-inhibiting hormone of *Penaeus monodon*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 312(1), 101-114.
- Yom-Din, S., Hollander-Cohen, L., Aizen, J., Boehm, B., Shpilman, M., Golan, M., . . . Levavi-Sivan, B. (2016). Gonadotropins in the Russian sturgeon: their role in steroid secretion and the effect of hormonal treatment on their secretion. *PLoS one*, 11(9).
- Zohar, Y., & Mylonas, C. C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes *Reproductive Biotechnology in Finfish Aquaculture* (pp. 99-136): Elsevier.