

## PROCESO REPRODUCTIVO EN INVERTEBRADOS MARINOS: NEUROTRANSMISORES Y AMP CICLICO.

Trabajo presentado en las XII Jornadas de Ciencias del Mar, Santiago, mayo 1992.

ELISEO O. CAMPOS<sup>1\*</sup>, FRANCISCA BRONFMAN<sup>1</sup>, ALBERTO RIVERA<sup>2</sup>, NIBALDO C. INESTROSA<sup>1</sup> y GLORIA MARTINEZ<sup>2</sup>

Eliseo O. Campos<sup>1</sup>, Francisca Bronfman<sup>1</sup>, Alberto Rivera<sup>2</sup>, Nibaldo C. Inestrosa<sup>1</sup> y Gloria. Martínez<sup>2</sup>: Reproductive Process on Marine Invertebrates: Neurotransmitters and Cyclic AMP.

The neurotransmitters and the hormones regulates the reproductive process in different animal species. At the intracellular level some of them, increase the level of the second messenger cyclic AMP (cAMP). In this work we have studied the effect of different neurotransmitters over the intracellular levels of cAMP in gonads of *Argopecten purpuratus* ("scallop of the north") and *Concholepas concholepas* ("loco"). Serotonin, dopamine, adrenaline and gamma-aminobutyric acid were able to raise the cAMP both in scallop and "loco". In "loco" the effect of dopamine was dose-dependent, with a maximum increase of the cyclic nucleotide at a concentration of  $10^{-6}$  M, over this concentration, the effect decreases returning to basal values at  $10^{-2}$  M. The effect of dopamine is transient, with a maximal rise at 2 min of exposure. These results suggest the existence both in scallop and "loco" of functional receptors for the different neurotransmitters assayed. These receptors are probably involved in the physiological and molecular control of the reproductive process in both marine invertebrates.

Key words: reproduction, scallop, loco, neurotransmitters, cyclic AMP.

1 Unidad de Neurobiología Molecular, Departamento de Biología Celular y Molecular Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.

2 Departamento de Biología Marina, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo.

\* Correspondencia: Eliseo O. Campos V. Unidad de Neurobiología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, FAX: 2-222 5515.

### INTRODUCCION

En los invertebrados marinos el crecimiento, la maduración y la liberación de los gametos son procesos controlados por la interacción de factores exógenos (como cambios de temperatura, salinidad, presión hidrostática, y alimentación, etc.) junto a factores endógenos como son las hormonas y los neurotransmisores. En los moluscos bivalvos y prosobranquios

no se ha demostrado la existencia de glándulas endocrinas epiteliales que puedan secretar hormonas. Debido a esto se ha pensado que serían las neurosecreciones, producidas en el sistema nervioso, las encargadas de coordinar químicamente los diferentes procesos fisiológicos (Geraerts, 1976; Joose & Geraerts, 1984). El sistema nervioso en los moluscos está constituido por cierto número de ganglios conectados por comisuras y te-

jido conectivo. Entre ellos los más comunes son el ganglio cerebral pareado, el pleural, el parietal, el pedal y, uno más simple, el visceral. Las células neurosecretoras están localizadas en la periferia de cada uno de estos ganglios y desde éstas se produciría la liberación de las neurosecreciones (Joose & Geraerts, 1984; Takeda, 1989).

En los estudios existentes en invertebrados marinos, las monoaminas han concentrado la atención. Así se han identificado los terminales nerviosos monoaminérgicos de las gónadas, los niveles de neurotransmisores y su relación con el ciclo reproductivo y el efecto que ellos ejercen sobre los procesos reproductivos (Stefano & Aiello, 1975; Chang *et al.*, 1984; Matsutani & Nomura, 1984; Khotimchenko *et al.*, 1985).

En el mecanismo de acción de los neurotransmisores y a nivel intracelular, actúan los llamados segundos mensajeros que pueden aumentar o disminuir sus niveles como respuesta a la interacción de ligandos específicos con los receptores correspondiente de la membrana plasmática, desencadenando hacia el interior de la célula una cascada de eventos bioquímicos que controlan los diferentes procesos fisiológicos celulares, incluyendo por cierto los procesos reproductivos.

Uno de los segundos mensajeros más estudiados es el AMP cíclico (AMPc), que se genera a partir de ATP por la acción de una enzima llamada adenil ciclasa (Greengard, 1979), enzima que puede ser estimulada o inhibida por la acción del neurotransmisor u hormona lo que determina un aumento o una dis-

minución del AMPc a nivel intracelular.

En los invertebrados marinos se ha descrito que procesos como la contracción muscular en *Mytilus* (Kohler & Lindl, 1980), la homeostasis iónica en bivalvos de agua dulce (Scheide & Dietz, 1986) y la función gonadal en moluscos y erizos (Khotimchenko & Deridovich, 1989), podrían ser controlados por neurotransmisores los que activando los receptores adecuados generarían AMPc como segundo mensajero.

En nuestro país, se ha iniciado desde hace algún tiempo la explotación comercial de moluscos, como es el caso del cultivo del *Argopecten purpuratus* (Bivalvia; Pectinidae) ("ostión del norte") y la captura indiscriminada de *Concholepas concholepas* (Mollusca; Gastropoda; Muricidae) ("loco") con los riesgos que conlleva una sobreexplotación del recurso. Ambos moluscos son recursos marinos de gran importancia socioeconómica y es por lo tanto necesario una mayor comprensión de la fisiología de estos moluscos, sobre todo de los procesos asociados a su reproducción y sus mecanismos subyacentes.

Al respecto, Martínez *et al.* (1992) han demostrado la presencia de monoaminas en el tejido nervioso, en las gónadas y en las branquias del "ostión del norte", junto a cambios en sus niveles asociados al ciclo reproductivo.

En este trabajo se inicia el estudio del efecto que diferentes neurotransmisores ejercen sobre los niveles intracelulares de AMPc, tanto en gónadas de "ostión" como de "loco", con el objeto no solo de conocer los procesos de regula-

ción involucrados en la reproducción de estos moluscos sino también llegar a manejar tecnológicamente dichos procesos.

Resultados preliminares de este trabajo han sido presentados previamente (Campos *et al.*, 1991; 1992).

## MATERIALES Y METODOS

**MATERIAL BIOLÓGICO:** las gónadas de *Argopecten purpuratus*, disecadas en sus porciones masculina y femenina, se obtuvieron de ejemplares provenientes del Centro de Cultivo de la Bahía de Tongoy (IV Región), mantenidos en los laboratorios de la Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Católica del Norte, en Coquimbo.

Las gónadas de *Concholepas concholepas* se disecaron a partir de ejemplares hembras, que provenían de Las Cruces (V Región), los que una vez capturados se trasladaron inmediatamente a la Unidad de Neurobiología Molecular de la Pontificia Universidad Católica de Chile en Santiago.

**EFFECTO IN VITRO DE LOS NEUROTRANSMISORES:** en "ostión" estos experimentos se realizaron en gónadas (porciones femenina y masculina) de animales recién desovados y en "loco" en gónadas maduras. Para esto se incubaron explantes de tejido (5 a 6 trozos de 2 a 3 mg cada uno) en agua de mar filtrada (Millipore de 0,45  $\mu$ m) en presencia de los neurotransmisores dopamina, serotonina, adrenalina, acetilcolina y ácido gamma aminobutírico (GABA) (Sigma Chem. Co., St. Louis, M.O., USA), con sus respectivos controles. Completados los tiempos de incubación se procedió a ex-

traer y cuantificar el AMPc de acuerdo al método descrito a continuación.

**EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE AMPc:** la extracción del AMPc de los tejidos se realizó por homogenización en ácido perclórico 0,5 N y centrifugación a 10.000 rpm. Se obtuvo así un sobrenadante que fue neutralizado con KOH 5 N hasta un pH próximo a 6.0. El precipitado de perclorato de potasio fue eliminado por centrifugación y el AMPc determinado en el sobrenadante. Este nucleótido se cuantificó por un método radiactivo de competencia, que se basa en la unión específica del AMPc a una proteína ligante (subunidad reguladora de la proteína quinasa) (Gilman, 1970). El AMPc no marcado de la muestra o del estándar compete con el radiactivo (de concentración conocida) por la proteína ligante. Con carbón activado se retiene todo el nucleótido marcado no unido, determinándose en una alcuota del sobrenadante la radiactividad que proviene del complejo proteína ligante-AMPc marcado unido, valor que se extrapola a una curva construida con concentraciones conocidas de AMPc.

**DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS:** se utilizó el método de Lowry *et al.* (1951), utilizando como estándar albúmina sérica de bovino.

## RESULTADOS

**NIVELES DE AMPc EN GONADAS DE "OSTION".**

En la figura 1 se muestra el efecto de distintos neurotransmisores sobre los niveles intracelulares de AMPc en las gónadas femenina (Fig. 1A) y masculina

(Fig. 1B) del "ostión". Se puede observar que los niveles basales (controles) entre ambas porciones son diferentes; en la porción femenina alcanzan a  $2,16 \pm 0,10$  pmoles de AMPc/mg de proteínas mientras que en la porción masculina los niveles son más elevados, alcanzando a  $7,64 \pm 0,24$  pmoles/mg de proteínas. De los neurotransmisores ensayados, en la

porción femenina de las gónadas, la dopamina y la adrenalina fueron los que ejercieron un efecto mayor, teniendo serotonina y GABA un efecto menor. Mientras tanto, en la porción masculina de las gónadas del "ostión", fueron la serotonina y la dopamina los neurotransmisores más efectivos en elevar los niveles del AMPc.

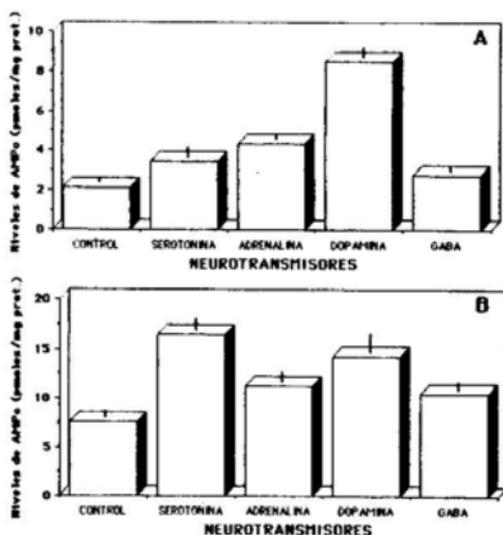


Figura 1. Efecto de neurotransmisores sobre los niveles intracelulares de AMP cíclico en gónadas de *Argopecten purpuratus* ("ostión").

Explantos de gónadas femeninas (A) y masculinas (B) de "ostión" (trozos de 2 a 3 mg) fueron incubados en presencia de los neurotransmisores indicados a una concentración de  $10^{-3} M$ , por dos minutos. Los resultados se expresan como pmoles de AMPc/mg de proteínas y corresponden al promedio  $\pm$  SEM (n=6).

## (B) NIVELES DE AMPc EN GONADAS DE "LOCO".

En las gónadas femeninas maduras de "loco" se ensayaron los mismos neurotransmisores anteriores, más la acetilcolina. Como se observa en la figura 2, los niveles basales alcanzaron a  $1,25 \pm 0,39$  pmoles de AMPc/mg de proteínas. Con la adición de acetilcolina no fue posible observar un aumento del AMPc intracelular, mientras que con serotonina, dopamina y adrenalina sí se produjeron cambios significativos, siendo el GABA el que ejerció un efecto menor.

En los mecanismos de acción de las hormonas y de los neurotransmisores, dos características son fundamentales para ejercer su acción. Una de ellas es que los efectos sean dependientes de la concentración del ligando y la otra es que su acción se traduzca en un efecto transiente a nivel del segundo mensajero generado (Greengard, 1979). Por esto nos interesó verificar para cada uno de los neurotransmisores ensayados estos dos efectos: concentración y tiempo. En el presente trabajo se presentan y discuten los resultados que se obtuvieron con dopamina.

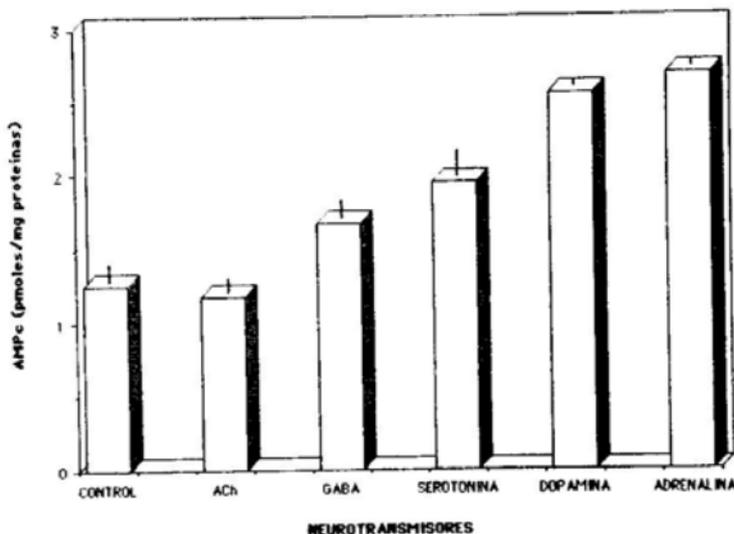


Figura 2. Efecto de neurotransmisores sobre los niveles intracelulares de AMP cíclico en gónadas de *Concholepas concholepas* ("loco").

Explantos de gónadas femeninas de "loco" (trozos de 2 a 3 mg) fueron incubados en presencia de los neurotransmisores indicados a una concentración de  $10^{-9}$  M, por dos minutos. Los resultados se expresan como pmoles de AMPc/mg de proteínas y corresponden al promedio  $\pm$  SEM ( $n=6$ ).

### EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE DOPAMINA SOBRE LOS NIVELES DE AMPc EN GONADAS DE "LOCO".

En la figura 3 se puede observar el efecto que ejercen distintas concentraciones de dopamina sobre los niveles intracelulares de AMPc. Desde un nivel basal de  $1,93 \pm 0,05$  pmoles AMPc/mg de proteínas, este neurotransmisor ejerce un efecto depen-

diente de la concentración. Así a una concentración de  $10^{-8}$  M de dopamina el AMPc es de  $2,30 \pm 0,09$ , alcanzándose un máximo de  $2,94 \pm 0,58$  pmoles/mg proteínas, con una concentración de  $10^{-6}$  M. Por arriba de esta concentración se produce una disminución del efecto inicial, llegando incluso a niveles por debajo del basal.

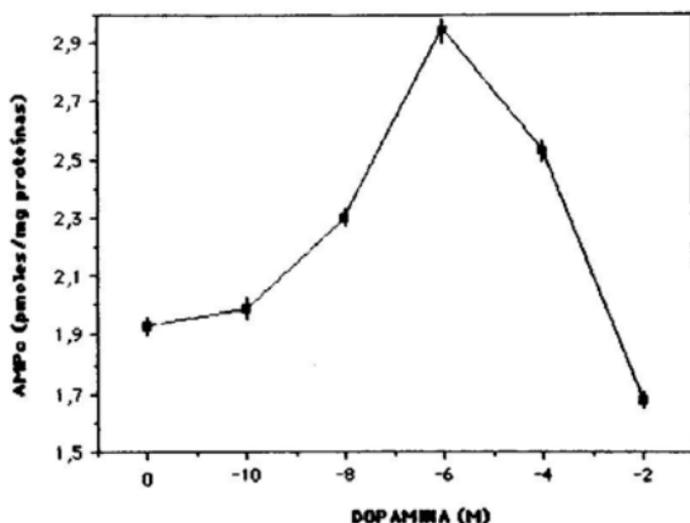


Figura 3. Efecto de la concentración de dopamina sobre los niveles intracelulares de AMP cíclico en gónadas de *Concholepas concholepas* ("loco").

Explantos de gónadas femeninas de "loco" (trozos de 2 a 3 mg) fueron incubados con concentraciones crecientes de dopamina ( $10^{-10}$  a  $10^{-2}$  M) por 2 minutos. Los resultados se expresan como pmoles de AMPc/mg de proteínas y corresponden al promedio  $\pm$  SEM ( $n=3$ ).

### CURSO TEMPORAL DEL EFECTO DE DOPAMINA SOBRE LOS NIVELES DE AMPc EN GONADAS DE "LOCO".

La curva del efecto temporal por un máximo de 15 minutos de exposición, se realizó con dopamina a una concentra-

ción de  $10^{-6}$  M con la que se había obtenido la respuesta máxima (ver Fig. 3). Como se observa en la figura 4, el efecto es de corta duración (transiente) obteniéndose un aumento máximo a los 2 minutos, para luego volver a los niveles

basales. El aumento, a los 2 minutos de estimulación, es de 5 veces por sobre el nivel basal, para luego volver rápida-

mente al nivel basal, situación que se mantiene durante el tiempo estudiado de 15 minutos.

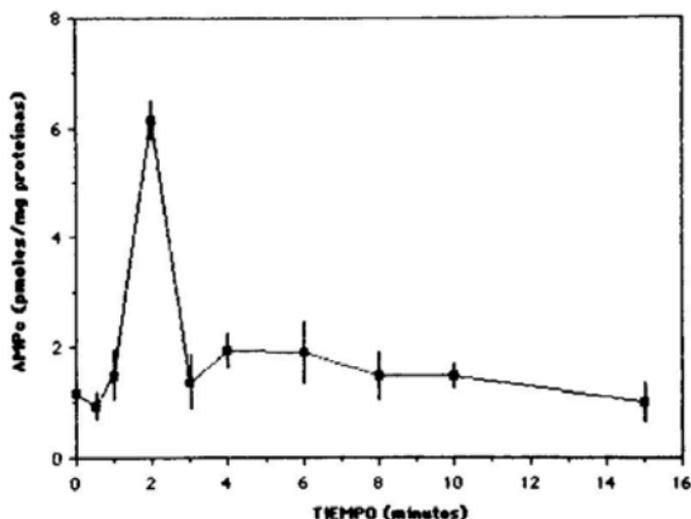


Figura 4. Curso temporal del efecto de dopamina, sobre los niveles intracelulares de AMP cíclico en gónadas de *Concholepas concholepas* ("loco").

Explantos de gónadas femeninas de "loco" (trozos de 2 a 3 mg) se incubaron con dopamina  $10^{-6}$  M y a los tiempos indicados se procedió a determinar la concentración de AMP cíclico. Los resultados se expresan como pmoles de AMPc/mg de proteínas y corresponden al promedio  $\pm$  SEM ( $n=3$ ).

## DISCUSION

Nuestros resultados indican que en las gónadas de "ostión" como de "loco" existirían receptores funcionales para los neurotransmisores serotonina, adrenalina, dopamina y GABA, lo cual fue determinado de manera indirecta, a través de la medición de los niveles intracelula-

res de AMPc generados al ser activados los receptores correspondientes.

En relación a los resultados obtenidos con las gónadas del "ostión", hermafrodita funcional con ciclo reproductivo continuo y dos épocas principales de desove en nuestro país (Wolff, 1988), estos son muy relevantes si uno los asocia a

los hallazgos de Martínez *et al.* (1992) quienes han demostrado la presencia de neurosecreciones (serotonina, dopamina y noradrenalina) en ganglios, branquias y gónadas de "ostión" donde existen variaciones de sus niveles, los cuales son dependientes del estado del ciclo reproductivo en que se encuentren los individuos. Así, por ejemplo en las gónadas, los niveles de noradrenalina mostraron un aumento significativo inmediatamente después del desove, lo cual también ocurre con la dopamina, mientras que en el caso de la serotonina no se detectaron diferencias significativas durante el tiempo de estudio. Estos resultados y la detección de niveles elevados de estas aminas en los ganglios, podrían indicar que ellas cumplen una función como neurohormonas.

En efecto, nuestros resultados acerca de la existencia y funcionalidad de receptores para dopamina, adrenalina y serotonina, nos permiten asociarlos a los obtenidos por Martínez *et al.* (1992) en el sentido que los procesos reproductivos o parte de ellos estén gobernados por estas neurosecreciones. Los cambios de los niveles en las aminas estudiadas, observados durante el ciclo reproductivo y los aumentos de los niveles intracelulares de AMPc al activar los receptores de las gónadas, nos permiten sugerir que las neurosecreciones constituirían parte del mecanismo de regulación y que ellas actuarían a través del segundo mensajero, AMPc.

La presencia de estas aminas en otros invertebrados ha sido demostrada en relación a la reproducción. Así, en *Mizuhopecten yessoensis* y en *Crenomytilus grananus* (Khotimchenko & Deridovich,

1991) se ha reportado que los niveles estacionales de la dopamina y de la serotonina coinciden con la máxima actividad gametogénica. Además, se observó un efecto estimulador de la dopamina sobre los niveles intracelulares de AMPc para el primero de ellos y también para las gónadas del erizo *Strongylocentrotus intermedius* (Khotimchenko & Deridovich, 1989).

En relación a la reproducción del "loco", especie dioica con fertilización interna, la información existente apunta a la descripción de un ciclo reproductivo anual (Ramorino, 1979), así como a la posibilidad de encontrar hembras con madurez máxima y posturas durante todo el año (Schuffeneeger *et al.*, 1989), lo que podría corresponder a diferentes modalidades de reproducción, condicionadas por los diferentes ambientes donde ocurren.

Al igual que en las especies más arriba mencionadas las gónadas de "loco" responden preferentemente a las aminas serotonina (55%), dopamina (108%) y adrenalina (115%) con diferentes magnitudes en su capacidad de elevar los niveles intracelulares de AMPc.

A pesar del gran incremento en el cultivo del "ostión" que se ha producido en Chile en los últimos años, persisten problemas que en gran parte derivan del desconocimiento de los aspectos biológicos básicos sobre este molusco. Uno de los aspectos críticos es la irregular obtención de semillas desde el medio natural, lo que ha obligado a desarrollar la producción controlada de éstas en condiciones de laboratorio. A su vez, esta producción depende en gran medida de la

disponibilidad de reproductores y del manejo de un buen desove que permita obtener larvas de una gran viabilidad.

Por otra parte, el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan o influyen en la reproducción del "loco" son absolutamente desconocidos. De tal forma que nuestros resultados acerca de la existencia de neurosecreciones y de la funcionalidad de los receptores respectivos, se pueden asociar a la idea del po-

tencial manejo de la maduración de las gónadas en el caso del "loco" y del desove en el caso del "ostión".

De tal manera que para estos moluscos el estudio de las neurosecreciones podría tener gran importancia, debido a que en un futuro cercano se podría constituir en una poderosa herramienta tecnológica para el manejo de reproductores en cautiverio.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por un Proyecto DGI de la Universidad Católica del Norte a G.M. y por el Proyecto Sectorial "Loco" FONDECYT 3502/89 a N.C.I.

#### LITERATURA CITADA

- Campos, E.O., Bronfman, F. y N.C. Inestrosa (1991) Niveles intracelulares de AMP cíclico en *Concholepas concholepas*. IV Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar, p. 87.
- Campos, E.O., Rivera, A., Bronfman, F., Belmar, J., Inestrosa, N.C. y G. Martínez (1992) Proceso reproductivo en invertebrados marinos: papel de los neurotransmisores y del AMP cíclico. XII Jornadas de Ciencias del Mar, p. 59.
- Chang, Y.J., Matsutani, T. & T. Nomura (1984) Enzyme histochemical localization of monoamine oxidase and acetylcholinesterase in the central nervous system of the scallop *Patinopecten yessoensis*. Mar. Biol. Lett. 5:335-345.
- Geraerts, W.P. (1976) Control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells on the fresh water snail *Lymnaea stagnalis*. Gen. Comp. Endocrinol., 29:61-71.
- Gilman, A. (1970) A protein binding assay for adenosine 3':5' cyclic monophosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67:305-312.
- Greengard, P. (1979) Cyclic nucleotides, phosphorylated proteins and the nervous system. Fed. Proc., 38(8):3367-3421.
- Joose, J. & W.P.M. Geraerts (1984) Endocrinology I "The Mollusca" (Salendin A.S.M. and Wilburg K.M., eds.) Academic Press, New York, 4:318-406.
- Kohler, G. & T. Lindl (1980) Effects of 5-hydroxytryptamine, dopamine, and acetylcholine on accumulation of cyclic AMP and cyclic GMP in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis* L. (Mollusca). Pflügers Arch., 383:257-262.

- Khotimchenko, Y.S., Deridovich, I.I. & E.A. Zalutskaya (1985) Spectrofluorometric determination of indolylalkylamines in gonads of Schinoderms. *Comp. Biochem. Physiol.*, **81C**:457-459.
- Khotimchenko, Y.S., & I.I. Deridovich (1989) The effect of dopamine and galoperidol on cAMP in the gonad of the bivalve mollusc *Mizohopecten yessoensis* and the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **92C**:23-26.
- Khotimchenko, Y.S., & I.I. Deridovich, (1991) Monoaminergic and cholinergic mechanism of reproduction control in the marine bivalve mollusc and echinoderms: a review. *Comp. Biochem. Physiol.*, **100C**:311-317.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & R.S. Randall (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**:265-275.
- Martínez, G., Rivera, A., Matus de la Parra, A.M. & F. Saleh (1992) Variaciones en los niveles de las neurosecreciones durante el ciclo reproductivo del ostión *Argopecten purpuratus*. XII Jornadas de Ciencias del Mar, Santiago-Chile, p. 119.
- Matsutani, T. & T. Nomura (1984) Localization of monoamines in the central nervous system and gonad of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **50**:425-430.
- Ramorino, L. (1979) Conocimiento científico actual sobre reproducción y desarrollo de *Concholepas concholepas* (Mollusca; Gastropoda; Muricidae). *Biol. Pesq.*, **12**:59-70.
- Scheide, J. & T. Dietz (1986) Serotonin regulation of gill cAMP production, Na<sup>+</sup> and water uptake in freshwater mussels. *J. Exp. Zool.*, **240**:309-314.
- Schuffeneger, M.R., Lozada, E. & P. Cañas (1989) Ciclo reproductivo de *Concholepas concholepas* (Bruguiere, 1789) en la zona de Coquimbo y Ancud. IX Jornadas de Ciencias del Mar, C14/77.
- Stefano, G.B. & E. Aiello (1975) Histofluorescent localization of serotonin and dopamine in the nervous system and gill of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Biol. Bull.*, **148**:141-156.
- Takeda, N. (1989) Hormonal control of reproduction in land snails. *Venus Jap. Jour. Malac.*, **48**(2):99-139.
- Wolff, M. (1988) Spawning and recruitment in the Peruvian scallop *Argopecten purpuratus*. *Marine Ecology - Progress Series*, **42**:213-217.