

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar

**“Inducción a la Maduración y Desove del robalo (*Centropomus nigrescens*) en
cautiverio mediante la utilización de las hormonas HCG (Gonadotropina
Coriónica Humana) y LHRHa (Luteinizing Hormone Releasing Hormone
Ethylamide)”.**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del Título de:

ACUICULTOR

Presentada por

Miguel Carvajal Veloz

GUAYAQUIL-ECUADOR

1997

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Miguel y Floor

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi sincera gratitud al Director del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, Dr. Jorge Calderon por permitirme utilizar las instalaciones del CENAIM para la realización de la presente tesis, y al Ac. Raúl Guartatanga, Director de mi tesis, por su comprensión y guía ofrecida durante el transcurso de la misma.

Agradezco a la Agencia Internacional de Cooperación Japonesa (JICA) por el soporte económico brindado, en especial al Ing. Masatoshi Futagawa y al Dr. Goro Yoshizaki por toda la información valiosa proporcionada.

Quisiera agradecer a Annick Bolland y Soraya Townsend por la ayuda ofrecida durante la realización de los ensayos y el análisis de los resultados obtenidos en la presente tesis.

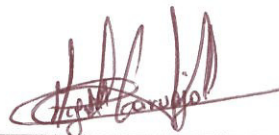
Agradezco a todo el personal que forma parte del Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas, por la ayuda sincera y desinteresada ofrecida durante mi estancia en el CENAIM.

Finalmente quisiera expresar mi más sincera gratitud a mis padres, Miguel Carvajal Pincay y Floor Veloz de Carvajal, hermanos, Jhonny y Vanessa, demás familiares y amigos por confiar en mí y ser el soporte fundamental durante los 6 meses dedicados a la realización de la presente tesis.

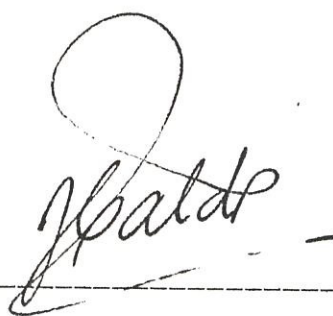
DECLARACION EXPRESA

“La responsabilidad por los hechos, ideas y doctrinas expuestos en esta tesis, me corresponden exclusivamente; y, el patrimonio intelectual de la misma, a la **ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL**”.

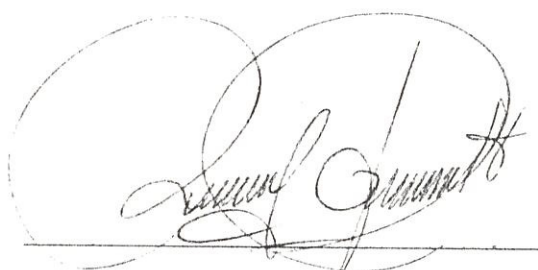
(Reglamento de Exámenes y Títulos profesionales de la ESPOL).



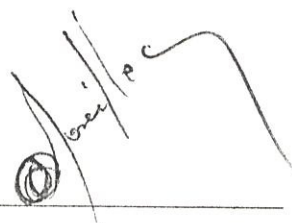
Miguel Carvajal Veloz



Dr. Jorge Calderón
Presidente del Tribunal



Ac. Raúl Guantatanga
Director de Tesis



Ing. Ecuador Marcillo
Miembro Principal

ABREVIATURAS

17 α ,20 β DP	: 17 α ,20 β di-hidroxi-4-pregnen-3-ona
g	: gramo(s)
GnRH	: hormona liberadora de gonadotropina
GRIF	: factor inhibidor de la liberación de gonadotropina
GtH	: gonadotropina
GVBD	: rompimiento de la membrana externa de la vesícula germinal
H-E	: hematoxilina-eosina
HCG	: gonadotropina coriónica humana
Kg	: kilogramo(s)
l	: litro(s)
LH	: hormona luteinizante
LHRH	: hormona liberadora de la hormona luteinizante
LHRHa	: des-Gly ¹⁰ ,[D-Ala ⁶] LHRH Etilamida
mg	: miligramo(s)
min	: minuto(s)
MIS	: esteroide inductor de la maduración
mm	: milímetro(s)
MPF	: factor promotor de la maduración
PAS	: periodic acid schiff
ppm	: partes por millón
RIA	: radio immuno assay
TM	: toneladas métricas
U.I.	: unidades internacionales
ups	: unidades prácticas de salinidad
μ g	: microgramo(s)
μ l	: microlitro

μm : micrómetro(s)

INDICE GENERAL

ABREVIATURAS.....	i
INDICE GENERAL.....	iii
INDICE DE FIGURAS Y ANEXOS.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	x
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCION.....	1
1. ANTECEDENTES.....	4
1.1. BIOLOGIA DEL ROBALO (<i>Centropomus nigrescens</i>).....	4
1.1.1 Clasificación taxonómica.....	4
1.1.2. Distribución geográfica.....	6
1.2. ENDOCRINOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LOS TELEOSTEOS.....	7
1.2.1. Control hormonal del desarrollo gonadal.....	7
1.2.1.1. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada.....	7
1.2.1.2. Ovogénesis.....	9
1.2.1.3. Espermatogénesis.....	17
1.2.2. Inducción del desarrollo gonadal por administración de hormonas exógenas.....	21

1.2.2.1. Extractos pituitarios.....	24
1.2.2.2. Gonadotropinas purificadas de peces.....	26
1.2.2.3. Esteroides.....	27
1.2.2.4. Gonadotropinas de mamíferos.....	28
1.2.2.5. Hormonas liberadoras de gonadotropina.....	30
2. MATERIALES Y METODOS.....	34
2.1 REPRODUCTORES.....	34
2.1.1 Obtención.....	34
2.1.2 Aclimatación.....	35
2.1.3. Marcación.....	35
2.1.4. Mantenimiento.....	35
2.1.5. Alimentación.....	36
2.2. HORMONAS.....	37
2.2.1. HCG (Gonadotropina Coriónica Humana).....	37
2.2.2. LHRHa (Luteinizing Hormone Releasing Hormone Ethylamide).....	37
2.3. SUMINISTRO DE HORMONAS IN VIVO.....	38
2.3.1. Anestesiado de los peces.....	38

2.3.2 Obtención de gametos.....	39
2.3.2.1. Hembras.....	39
2.3.2.2. Machos.....	39
2.3.3. Aplicación de hormonas.....	40
2.3.3.1. HCG (Gonadotropina Coriónica Humana)...	40
2.3.3.2. LHRHa (Luteinizing Hormone Releasing Hormone Ethylamide).....	40
2.4. SEGUIMIENTO DEL DESARROLLO GONADAL.....	40
2.5. INCUBACION DE HUEVOS.....	41
3. RESULTADOS.....	43
3.1 INDUCCION HORMONAL DE LA MADURACION, DESOVE Y ESPERMIACION DE LOS ROBALOS DEL GRUPO No 1.....	43
3.1.1. Primera inducción.....	43
3.1.2. Segunda inducción.....	53
3.1.3. Tercera inducción.....	54
3.2. INDUCCION HORMONAL DE LA MADURACION, DESOVE Y ESPERMIACION DE LOS ROBALOS DEL GRUPO No 2.....	55
3.2.1 Primera inducción.....	55
3.2.2. Segunda inducción.....	57
3.2.3. Tercera inducción.....	59

3.3. EVALUACION DEL DESARROLLO GONADAL DE LAS	
HEMBRAS DE ROBALO.....	59
DISCUSION.....	64
CONCLUSIONES.....	73
RECOMENDACIONES.....	74
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	76

INDICE DE FIGURAS Y ANEXOS

Figura 1.	Características morfológicas del robalo.....	6
Figura 2.	Enlaces neuro-endócrinos del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada (Después de Shepherd y Bromage, 1988).....	8
Figura 3.	Diagrama general de un oocito con su respectivo folículo ovárico (Después de Redding y Patiño, 1993).....	10
Figura 4.	Regulación hormonal de la vitelogénesis en los teleósteos (Después de Nagahama <i>et al.</i> , 1995).....	11
Figura 5.	Biosíntesis de 17β -Estradiol en el folículo de salmón (Después de Nagahama <i>et al.</i> , 1995).....	12
Figura 6.	Regulación hormonal de la maduración de los oocitos en los teleósteos (Después de Nagahama <i>et al.</i> , 1995).....	13
Figura 7.	Biosíntesis del 17α , 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona en el folículo de salmón (Después de Nagahama <i>et al.</i> , 1995).....	14
Figura 8.	Modelo de la formación y activación del factor promotor de la maduración (MPF) durante la maduración del oocito (Después de Nagahama <i>et al.</i> , 1995).....	16
Figura 9.	Diagrama general del túbulo espermático, y esquema del desarrollo gonadal desde espermatogonia hasta espermatozoide (Después de Nagahama, 1983).....	17
Figura 10.	Diagrama general del espermatozoide del salmón (Después de Takashima e Hibiya, 1995).....	18

Figura 11.	Regulación hormonal de la espermatogénesis en el testículo de la anguila (Después de Nagahama, 1994).....	19	X
Figura 12.	Regulación hormonal de la motilidad espermática en salmónidos (Después de Nagahama, 1994).....	20	
Figura 13.	Resumen de las hormonas exógenas utilizadas para inducir la maduración y desove en los teleósteos y nivel de acción (Después de Harvey y Hoar, 1979).....	24	
Figura 14.	Estructuras primarias de GnRHs aisladas del cerebro de los vertebrados. (Tomado de Carrillo, 1997).....	31	
Figura 15.	Conformación estructural de 2 compuestos análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (Tomado de Nagahama, 1983).	32	
Figura 16.	Diagrama del tanque de robalos ubicado en el área de maduración de camarones del CENAIM.....	36	
Figura 17.	Tanques utilizados para separación y eclosión de huevos de robalos..	42	
Figura 18.	Distribución de los oocitos de la hembra No. 1 antes y después de la inducción hormonal con HCG.....	47	
Figura 19.	Distribución de los oocitos de la hembra No. 4 antes y después de la inducción hormonal con HCG.....	48	
Figura 20.	Distribución de los oocitos de la hembra No. 5 antes y después de la inducción hormonal con HCG.....	48	
Figura 21.	Distribución de los oocitos de la hembra No. 10 antes de la inducción hormonal con HCG.....	49	

Figura 22.	Oocitos de robalo en estado perinucleolar.....	49
Figura 23.	Oocitos de robalo en fase vitelogénica.....	50
Figura 24.	Oocitos de robalo en fase de maduración.....	50
Figura 25.	Oocito de robalo previo a ovulación.....	51
Figura 26.	Huevo fertilizados de robalo en fase de blástula.....	53
Figura 27.	Corte histológico de ovario de robalo mostrando tejido conectivo y oocitos en estado perinucleolar.....	61
Figura 28.	Corte histológico de hígado de robalo mostrando hepatocitos con presencia de glicoproteínas. Tinción PAS.....	62
Figura 29.	Corte histológico de hígado de robalo mostrando presencia de vacuolas lipídicas alrededor del tejido pancreático y hemorragias ocupando los sinusoides del tejido hepático. Tinción H-E.....	63
Anexo 1.	Promedio mensual de la temperatura, pH y Oxígeno disuelto medidos durante el bioensayo.....	85

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Captura de reproductores de robalo.....	34
Tabla 2.	Primer implante de pellets con LHRHa a reproductores del primer grupo, 04/02/97.....	44
Tabla 3.	Inducción del desove de hembras del primer grupo con HCG, 26/02/97.....	45
Tabla 4.	Desoves de robalos inducidos con LHRHa+HCG.....	52
Tabla 5.	Segundo implante de pellets con LHRHa a reproductores del primer grupo, 07/05/97.....	54
Tabla 6.	Tercer implante de pellets con LHRHa a reproductores del primer grupo, 22/05/97.....	54
Tabla 7.	Inducción del desarrollo gonadal de reproductores del primer grupo con HCG, 09/06/97.....	55
Tabla 8.	Primer implante de pellets con LHRHa a reproductores del segundo grupo, 20/03/97.....	56
Tabla 9.	Segundo implante de pellets con LHRHa a reproductores del segundo grupo, 01/04/97.....	57
Tabla 10.	Tercer implante de pellets con LHRHa a reproductores del segundo grupo, 08/05/97.....	58
Tabla 11.	Cuarto implante de pellets con LHRHa a reproductores del segundo grupo, 23/05/97.....	58
Tabla 12.	Inducción del desarrollo gonadal de reproductores del	

segundo grupo con HCG, 10/06/97.....	59
--------------------------------------	----

RESUMEN

El principal problema que presenta el cultivo del robalo *Centropomus nigrescens* es la inhibición de su ciclo reproductivo en cautiverio. Con el objeto de evaluar el efecto de la administración de hormonas exógenas, sobre el desarrollo gonadal en esta especie, se utilizaron las hormonas LHRHa y HCG para inducir dicho proceso.

En el primer ensayo, las hembras de robalo mantenidas en cautiverio en el CENAIM presentaron oocitos perinucleolares y vitelogénicos que sufrieron maduración al administrarle 96-106,6 μg LHRHa.Kg⁻¹ de peso, mismos que posteriormente fueron desovados al ser inducidas las hembras con una sola dosis de 1.000 U.I. HCG.Kg⁻¹ de reproductor. La cantidad total de huevos desovados durante un período de 7 días fue 6.637.000, con un diámetro promedio de 743,7 $\pm$ 27,6 μm , los huevos viables representaron 8,85% del total, y el porcentaje de fertilización fue 0,7%. El desarrollo de los huevos fertilizados se detuvo en la etapa de blástula. La baja tasa de viabilidad y de fertilización obtenida en el presente ensayo, podría ser debida principalmente a la pobre calidad de los huevos como consecuencia de la avanzada edad de los reproductores.

En posteriores inducciones con LHRHa, los oocitos perinucleolares incrementaron su diámetro, sin sufrir vitelogénesis. Al sacrificar dos hembras, se observó que el hígado presentaba degeneración lipoidea o acumulación de grasa, causada por una dieta con elevado contenido lipídico, siendo esta la principal causa de la no realización de vitelogénesis.

En una de tres inducciones con dosis de 70,1-142,8 μg LHRHa.Kg⁻¹ de peso, los machos presentaron espermiación, mientras que una sola dosis de 500 U.I. HCG.Kg⁻¹ de peso estimuló la espermiación de todos los reproductores en cada tratamiento.

Los resultados obtenidos, aunque preliminares, indican que la LHRHa y la HCG pueden ser utilizadas para estimular el desarrollo gonadal del *Centropomus nigrescens*.

INTRODUCCION

Uno de los principales constituyentes de la dieta humana es el pescado y la forma de obtención de este recurso es la pesca, pero la existencia de organismos acuáticos en estado natural son limitadas y el razonamiento ecológico sugiere que se llegará al límite de la captura de los mismos. Por lo tanto, existe la imperiosa necesidad de encontrar nuevas formas de obtener el producto de la pesca: el cultivo de peces marinos puede constituir una contribución importante para la nutrición en muchas partes del mundo por el hecho de ser fuente principal de proteínas (Bardach *et al.*, 1986).

La actividad acuícola en el Ecuador está orientada principalmente al cultivo de camarón, pero en la última década ésta industria ha encontrado problemas de productividad debido a escasez de larvas salvajes, mal manejo del recurso y aparición de nuevas enfermedades como el síndrome de Taura entre otros. El cultivo de peces marinos endémicos de la región es una de las opciones utilizada actualmente en los países Latinoamericanos, que puede ser empleada en sector camaronero y pesquero ecuatoriano con el propósito de suplir el consumo local y a la vez incrementar las fuentes de divisas vía su exportación.

El robalo (*Centropomus* sp.) se ubica dentro del grupo de peces marinos con mayor potencial de cultivo en latitudes tropicales y subtropicales, principalmente en América del Sur (Vásquez, 1988). Su desarrollo es posible debido a las cualidades que posee: es relativamente inactivo (Tucker, 1987), puede sobrevivir en medios con concentraciones de oxígeno disuelto de hasta 0,4 ppm (Shafland y Koehl, 1979), presenta una excelente capacidad de regulación osmótica (Chapman *et al.*, 1982) llegando a ser encontrado en salinidades que varían de 0 (Oliveira, 1979 *fide* Nogueira, 1991) a 54 ups (Silva, 1967/1969 *fide* Nogueira, 1991) y tolera variadas condiciones de temperatura (Chapman *et al.*, 1982; Shafland y Koehl, 1979; Tucker, 1987). Se adapta a ambientes artificiales, acepta dietas inertes, presenta rápido crecimiento llegando a pesar 450-500 g entre los seis y ocho meses de edad (Cerqueira, 1990; Cerqueira *et al.*, 1992; Hygby y Beuling, 1988;

Muhlia *et al.*, 1994b; Nogueira, 1991; Tucker, 1987). Su rendimiento de carne está en el orden del 57% (Tucker *et al.*, 1985), valor bastante elevado si se compara con otros peces cultivados como el bagre del canal (*Ictalurus punctatus*) 35-40% (Ayers, 1984 *fide* Tucker *et al.*, 1985), tilapia mosambica (*Oreochromis mossambicus*) 40% (Miller, 1974 *fide* Tucker *et al.*, 1985) y pez rojo (*Sciaenops ocellatus*) 41% (Guartatanga *et al.*, 1993).

Considerando su naturaleza predadora, es posible realizar policultivos de robalo con especies prolíficas tales como carpa (*Ciprinus carpio*) (Schaperclaus, 1933 *fide* Nogueira, 1991), lisa (*Mugil brasiliensis*) (Rocha y Okada, 1980), tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Chapman *et al.*, 1982) en donde cumplen la función de controlador biológico al alimentarse de los alevines que se originan durante el ciclo de cultivo, permitiendo tener individuos de un mismo peso al momento de la cosecha.

Su importancia comercial se debe a la consistencia, blancura y sabor de su carne que lo hacen excelente para consumo humano, lo que permite que sus filetes tengan gran aceptación y sea un producto de elevado valor en el mercado internacional, llegando a alcanzar 20 dólares el kilo en Estados Unidos (Muhlia *et al.*, 1994a).

El mayor obstáculo para el desarrollo e intensificación del cultivo comercial del robalo es que su ciclo reproductivo no se realiza fácilmente en cautiverio. Mientras la vitelogénesis y espermatogénesis llega a su término, la maduración del oocito, ovulación, desove y espermiación no ocurre debido a una carencia en la producción de gonadotropina (Zohar *et al.*, 1989). Por esta razón el control de la reproducción es un prerequisite para el desarrollo a gran escala de técnicas de cultivo del robalo.

El desarrollo gonadal puede ser controlado por la manipulación de factores ambientales tales como: temperatura y fotoperíodo. Debido a los elevados costos que implica la adaptación y mantenimiento de un sistema que controle éstas variables, en el área de reproducción de una piscifactoría a nivel comercial, el más práctico y confiable método de control sobre dicho proceso consiste en el uso de químicos exógenos tales como

hormonas que estimulan el desarrollo y madurez de oocitos y espermatozoides (Harvey y Hoar, 1979).

El presente estudio se centra en el siguiente objetivo: Evaluar el efecto de las hormonas LHRHa (des-Gly¹⁰, [D-Ala⁶] LHRH Etilamida) y HCG (Gonadotropina Coriónica Humana) en el proceso de desarrollo gonadal de reproductores de robalo en cautiverio.

1. ANTECEDENTES

1.1. BIOLOGIA DEL ROBALO (*Centropomus nigrescens*)

1.1.1 Clasificación taxonómica

Filo *Vertebrata*

Sub-filo *Craniata*

Super-clase *Gnathostomata*

Serie *Pisces*

Clase *Osteichthyes*

Subclase *Actinopterygii*

Orden *Perciformes*

Sub-orden *Percoidei*

Super-familia *Percoidea*

Familia *Centropomidae*

Subfamilia *Centropominae*

Género *Centropomus*

Especie *Centropomus nigrescens*

De las treinta especies que fueron inicialmente descritas, actualmente son reconocidas únicamente doce que pertenecen al género *Centropomus* : *C. pectinatus*, *C. medius*, *C. undecimalis*, *C. nigrescens*, *C. viridis*, *C. poeyi*, *C. parallelus*, *C. mexicanus*, *C.*

unionensis, *C. armatus*, *C. robalito* y *C. ensiferus* (Rivas, 1986).

Las especies pertenecientes al género *Centropomus* son peces percomorfos que tienen el cuerpo alargado y fusiforme, con un perfil dorsal acentuadamente convexo y un perfil ventral casi recto hasta la región del pedúnculo caudal donde se encuentra una ligera curvatura. Poseen una línea lateral remarcada por una banda de color negro que recorre longitudinalmente todo el cuerpo y penetra hasta el margen posterior de la aleta caudal que se encuentra bifurcada en su segmento terminal (Fig. 1) (Gerald y De Ross, 1991; Nogueira, 1991; Rivas, 1986; Ruiz, 1993). La coloración del cuerpo varía de gris azulado u oscuro en el dorso a plateado en la región ventral (Muhlia *et al.*, 1994a).

La región cefálica es alargada y aplanada dorsalmente (Chirichigno, 1974; Ruiz, 1993), en ésta sobresale una boca grande y protráctil con la mandíbula inferior más prominente lo que le da a ésta una posición superior (Fig. 1) (Gerald y De Ross, 1991; Muhlia *et al.*, 1994a; Nogueira, 1991; Rivas, 1986; Ruiz, 1993).

En la región dorsal se encuentran dos aletas separadas. La anterior de forma triangular está formada por fuertes espinas conectadas entre sí por una membrana, la posterior de forma trapezoidal está compuesta por una espina y radios ramificados de número variable. (Muhlia *et al.*, 1994a; Ruiz, 1993). La aleta anal esta conformada por tres espinas y radios presentes en número variable (Fig. 1) (Rivas, 1986).

Además de las características mencionadas anteriormente, los robalos presentan nostrilos en la cabeza, estos tienen una función olfativa y se encuentran en número de 4, dos a cada lado del eje longitudinal de la cabeza (Lagler *et al.*, 1977).

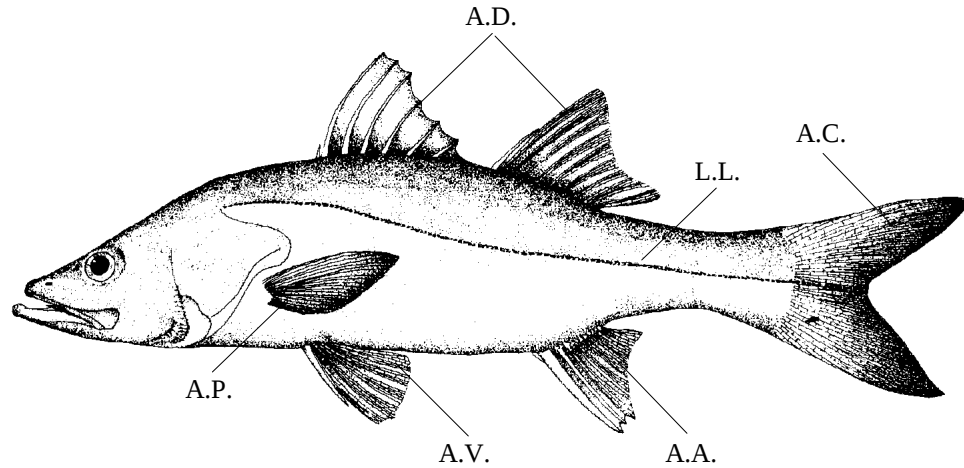


Fig. 1. Características morfológicas del robalo. A.D.: aleta dorsal; A.P.: aleta pectoral; A.V.: aleta ventral; A.A.: aleta anal; A.C.: aleta caudal; L.L.: línea lateral.

1.1.2. Distribución geográfica

El género *Centropomus* agrupa especies tropicales y subtropicales eurihalinas con una fuerte tendencia a alimentarse y crecer en cuerpos de agua de baja salinidad (Lacepede, 1802 *fide* Muhlia *et al.*, 1994a).

Los robalos habitan en ambientes acuáticos continentales y en zonas estuarinas no muy profundas con presencia de manglares y sustrato pedregoso o arenoso, llegando incluso a encontrárselos en zonas de agua dulce como lagos y ríos (Chavez, 1963; Marshall, 1958; Volpe, 1959). Debido a esta capacidad de habitar en ambientes con salinidades diferentes, Mota-Alves (1981 *fide* Nogueira, 1991) consideró a los robalos (*Centropomus* sp.) como especies osmoconformistas o anfídromos.

El *Centropomus nigrescens* es localizado en las costas del Pacífico desde El Golfo de California hasta el Ecuador y norte de Perú (Ruiz, 1993).

1.2. ENDOCRINOLOGIA DE LA REPRODUCCION DE LOS TELEOSTEOS

1.2.1. Control hormonal del desarrollo gonadal

Los factores del medio ambiente son los responsables de la inducción inicial del desarrollo gonadal, las hormonas producidas por el sistema endocrino son las que controlan éste proceso (Shepherd y Bromage, 1988).

1.2.1.1. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada

Los sistemas nervioso y endocrino de los vertebrados actúan conjuntamente para coordinar los eventos reproductivos de los teleósteos, siendo el eje hipotálamo-hipófisis-gónada el que controla dicho proceso.

El esquema general del control hormonal que ejerce el sistema neuroendocrino sobre el proceso de ovogénesis y espermatogénesis es el siguiente:

Fotoreceptores de la retina o quimorreceptores del epitelio olfatorio son los encargados de captar y convertir los estímulos ambientales en señales electroquímicas que se dirigen vía neuronas sensoriales al cerebro y de ahí al hipotálamo, donde son procesadas induciendo a la secreción de hormonas peptídicas como GnRH (hormona liberadora de gonadotropina), en ciertas especies el GRIF (factor inhibidor de la liberación de gonadotropina). Estas hormonas se dirigen a la glándula pituitaria donde inducen y regulan la producción de la hormona GtH (hormona gonadotropina), que luego es liberada al torrente sanguíneo por donde circula hasta llegar a las gónadas, órganos productores de esteroides que son los que directamente controlan el desarrollo gonadal (Fig. 2) (Shepherd y Bromage, 1988; Patiño, 1995).

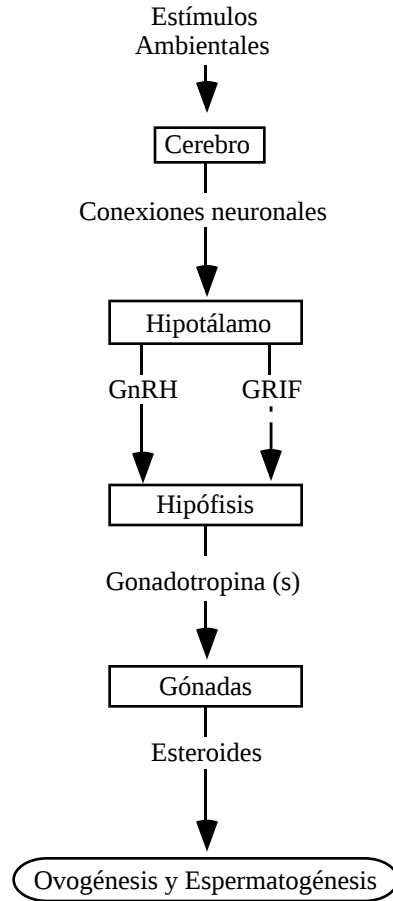


Fig. 2. Enlaces neuro-endocrinos del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada (Después de Shepherd y Bromage, 1988). GnRH, hormona liberadora de gonadotropina; GRIF, factor inhibidor de la liberación de gonadotropina.

Existen dos tipos de gonadotropinas producidas y secretadas por parte de las células gonadotrópicas localizadas en el *pars distalis proximalis* de la glándula hipofisiaria :

- 1) Gonadotropina tipo I o vitelogénica que interviene en el proceso de incorporación de vitelo al citoplasma del oocito (Idler y Ng, 1983; Matty, 1985; Nagahama, 1994; Nagahama *et al.*, 1995; Thomas, 1994; Zohar, 1989).
- 2) Gonadotropina tipo II o maduracional que interviene en el proceso de esteroidogénesis, espermatogénesis, espermiogénesis, espermiación, maduración del oocito y ovulación (Idler y Ng, 1983; Matty, 1985; Nagahama, 1994; Nagahama *et al.*, 1995; Thomas, 1994; Zohar, 1989).

1.2.1.2. Ovogénesis

La ovogénesis es el proceso de desarrollo del oocito a partir del cual resulta la más grande de las células que se pueda encontrar en los peces, y que además presenta la particularidad de poder producir un nuevo individuo de la misma especie después de su fertilización (Lagler *et al.*, 1977).

El ovario de las hembras sexualmente inmaduras se encuentra conformado principalmente por epitelio germinativo a partir del cual se van a diferenciar las oogonias durante la época de diferenciación sexual (Takashima e Hibiya, 1995).

Al alcanzar la época de madurez sexual, el proceso de ovogénesis se inicia con una etapa de proliferación oogonial en el que las oogonias que se encuentran en el ovario sufren dos divisiones mitóticas y una meiótica que se detiene al llegar a la profase, transformándose en oocitos primarios. En ésta etapa los oocitos se encuentran rodeados por una capa de células epiteliales que forman el folículo ovárico (Harvey y Hoar, 1979; Nagahama, 1983; Zohar, 1989).

Posteriormente los oocitos entran en una primera etapa de crecimiento denominada previtelogénesis, en ésta fase los oocitos se caracterizan por un gran núcleo rodeado por numerosos nucleolos, además de la presencia en el citoplasma de una estructura denominada corpúsculo de Balbiani formado por varios organelos celulares tales como mitocondrias, cuerpos de Golgi, retículo endoplásmico granuloso, cuerpos multivesiculares, y gránulos de lípidos. En conjunto tienen la función de servir de centro metabólico y de formación de organelos dentro del oocito. Durante la previtelogénesis, las células del epitelio folicular se diferencian para formar dos capas. La capa interna conformada por células cúbicas es la granulosa y la externa formada de células elongadas y planas es la teca, ambas capas se encuentran separadas por una membrana base; además una membrana gruesa se forma entre el oocito y la capa granulosa, y se denomina membrana vitelina o zona pelúcida que se caracteriza por tener una apariencia estriada,

debido a que se encuentra atravesada por microvellosidades procedentes del oocito y de las células foliculares, que actúan en el transporte de nutrientes hacia el oocito por falta de irrigación sanguínea (Fig. 3) (Nagahama, 1983; Zohar, 1989).

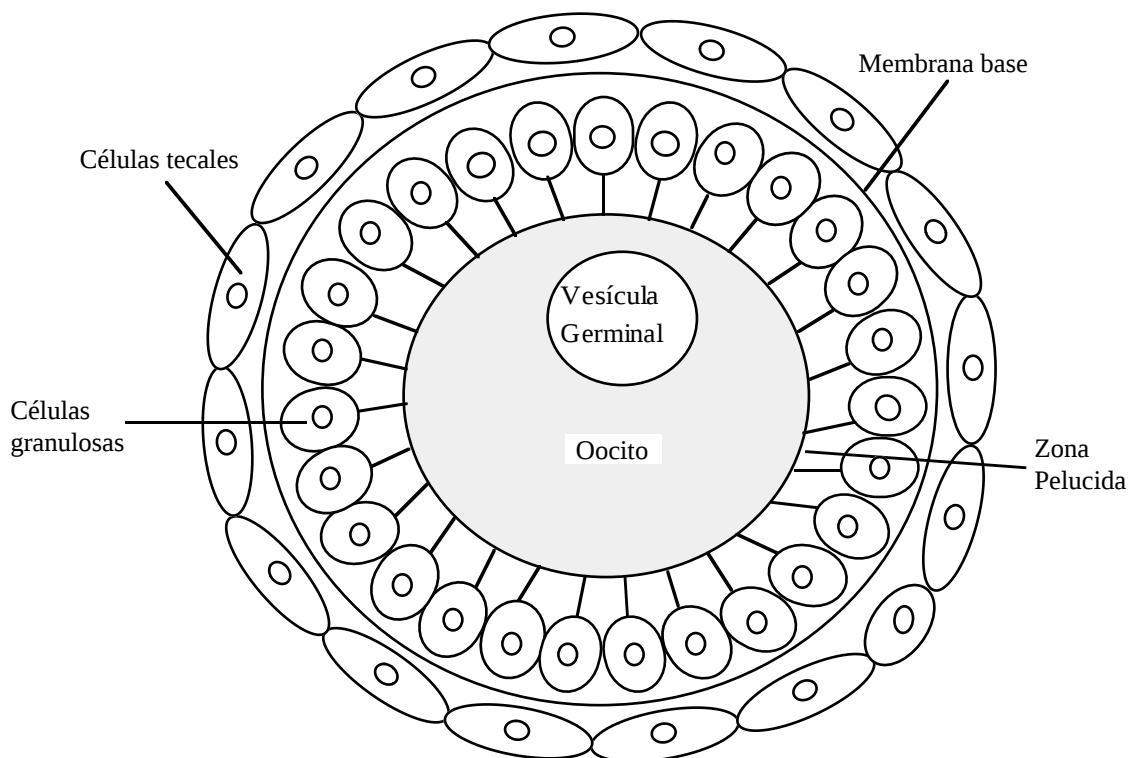


Fig. 3. Diagrama general de un oocito con su respectivo folículo ovárico (Después de Redding y Patiño, 1993).

La siguiente fase es la vitelogénesis que comprende la incorporación de vitelo a su citoplasma, material conformado por: proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos que sirven como fuente de energía durante el desarrollo embrionario (Hopson y Wessells, 1990). El vitelo se deposita bajo la forma de: gotas de aceite, vesículas y gránulos de vitelo (Harvey y Hoar, 1979; Piper *et al.*, 1992). Esta fase se divide en vitelogénesis endógena y exógena; durante la vitelogénesis endógena se producen dentro del oocito, las gotas de aceite y las vesículas de vitelo, interviniendo en el proceso el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi; mientras que en la vitelogénesis exógena los gránulos de vitelo se producen a partir de la vitelogenina, fosfolipoproteína producida y secretada por el hígado (Nagahama, 1983; Ng e Idler, 1983; Zohar, 1989).

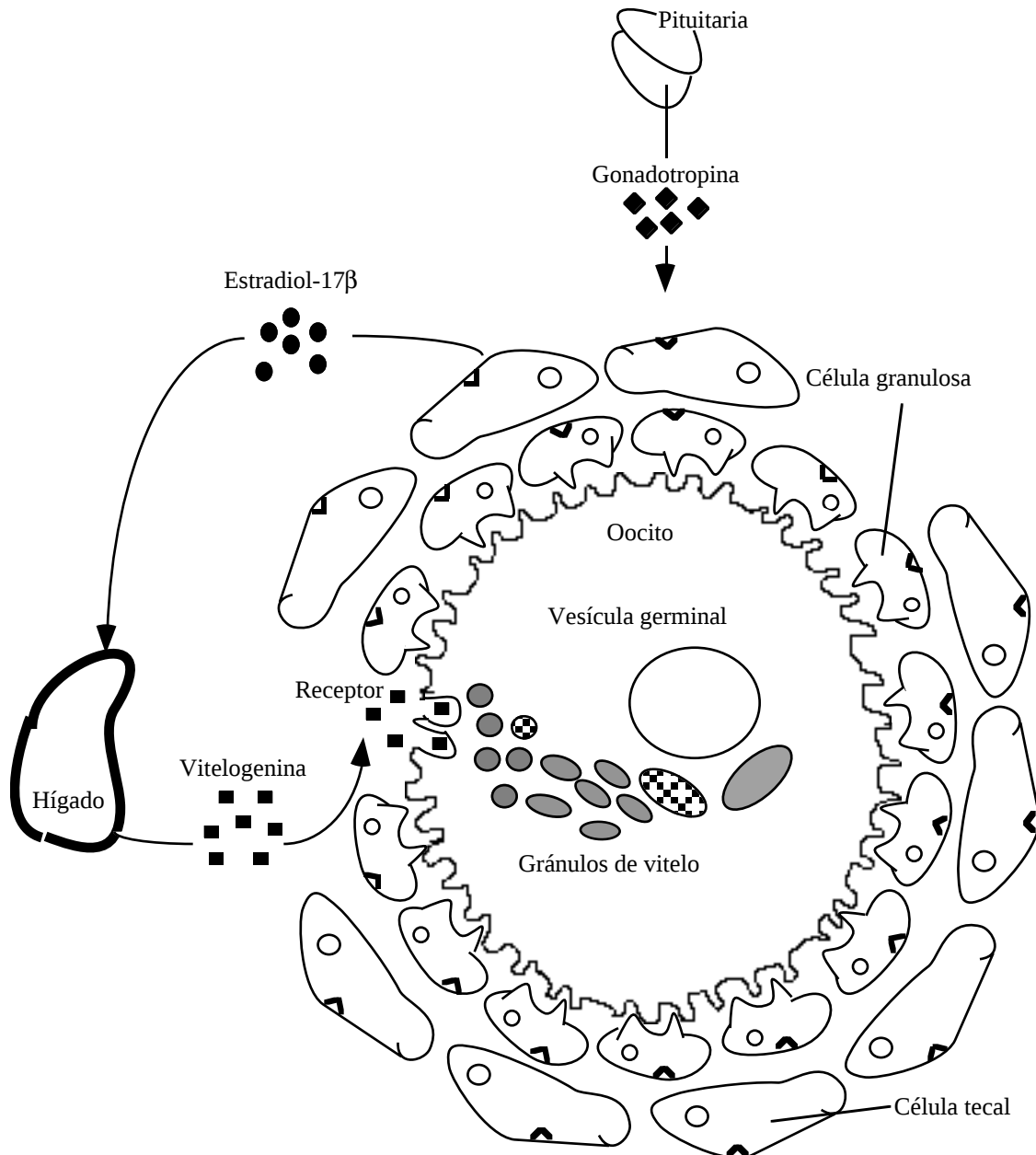


Fig. 4. Regulación hormonal de la vitelogenesis en los teleosteos (Después de Nagahama *et al.* 1995).

El proceso hormonal que ocurre durante la vitelogenesis es el siguiente: la capa folicular bajo la influencia de la GtH II produce estradiol-17β, liberada al sistema circulatorio y al llegar al hígado estimula la síntesis y secreción de vitelogenina al torrente sanguíneo por donde es transportado hacia el ovario, atravieza el folículo ovárico y se adhiere a receptores específicos ubicados en la superficie del oocito siendo incorporado al citoplasma mediante micropinocitosis. Una vez dentro del oocito la vitelogenina sufre proteolisis dando origen

a las proteínas lipovitelina y fosvitina, componentes de los gránulos de vitelo (Fig. 4) (Nagahama, 1983; Nagahama *et al.*, 1995; Ng e Idler, 1983; Zohar, 1989).

La producción de estradiol-17 β por parte del folículo involucra la intervención de ambas capas celulares en el proceso. La capa tecal bajo la influencia de la GtH II produce el andrógeno testosterona a partir del colesterol, que es liberado y se adhiere a la capa granulosa donde es aromatizado a estradiol-17 β (Fig. 5) (Nagahama, 1987; Nagahama, 1994; Nagahama *et al.*, 1995; Zohar, 1989).

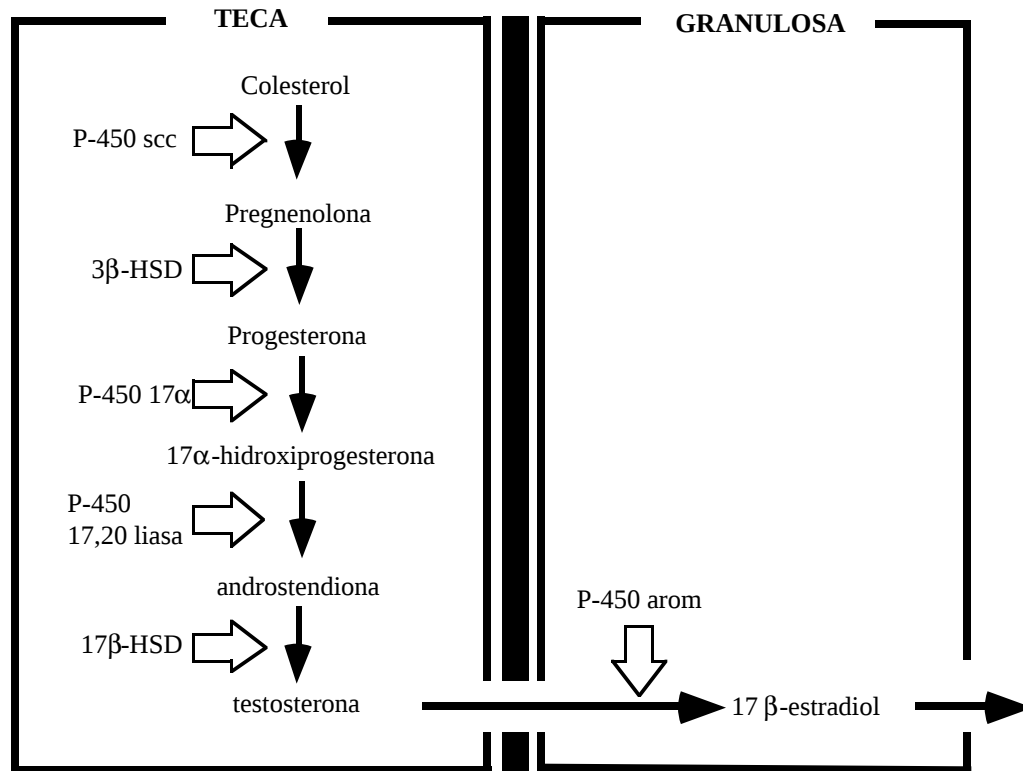


Fig. 5. Biosíntesis de 17 β -Estradiol en el folículo de salmón (Después de Nagahama *et al.*, 1995). P-450 scc, Citocromo P-450 liberador de las cadenas laterales del colesterol; 3 β -HSD, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa; P-450 17 α , P-450 17 α -hidroxilasa; 17 β -HSD, 17 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa; P-450 arom., citocromo aromatasa P-450.

Los oocitos postvitelogénicos son fisiológicamente inmaduros por lo que no pueden ser fertilizados. Para que esto ocurra es necesario que se produzca la maduración final de los oocitos luego de la vitelogénesis. Esto implica la migración de la vesícula germinal (núcleo) del centro hacia el polo animal y el rompimiento de su membrana externa reanudándose la división meiótica que se detuvo en la primera fase de la oogénesis.

Durante ésta fase la primera división meiótica es finalizada y se forma el primer cuerpo polar que es expulsado del oocito. Al mismo tiempo se produce la fusión de los gránulos de vitelo y de las gotas lipídicas y el incremento en el tamaño del oocito debido a su hidratación (Nagahama *et al.*, 1995; Redding y Patiño, 1993; Takashima e Hibiya, 1995; Wallace y Selman, 1981 *fide* Mylonas *et al.*, 1996; Zohar, 1989).

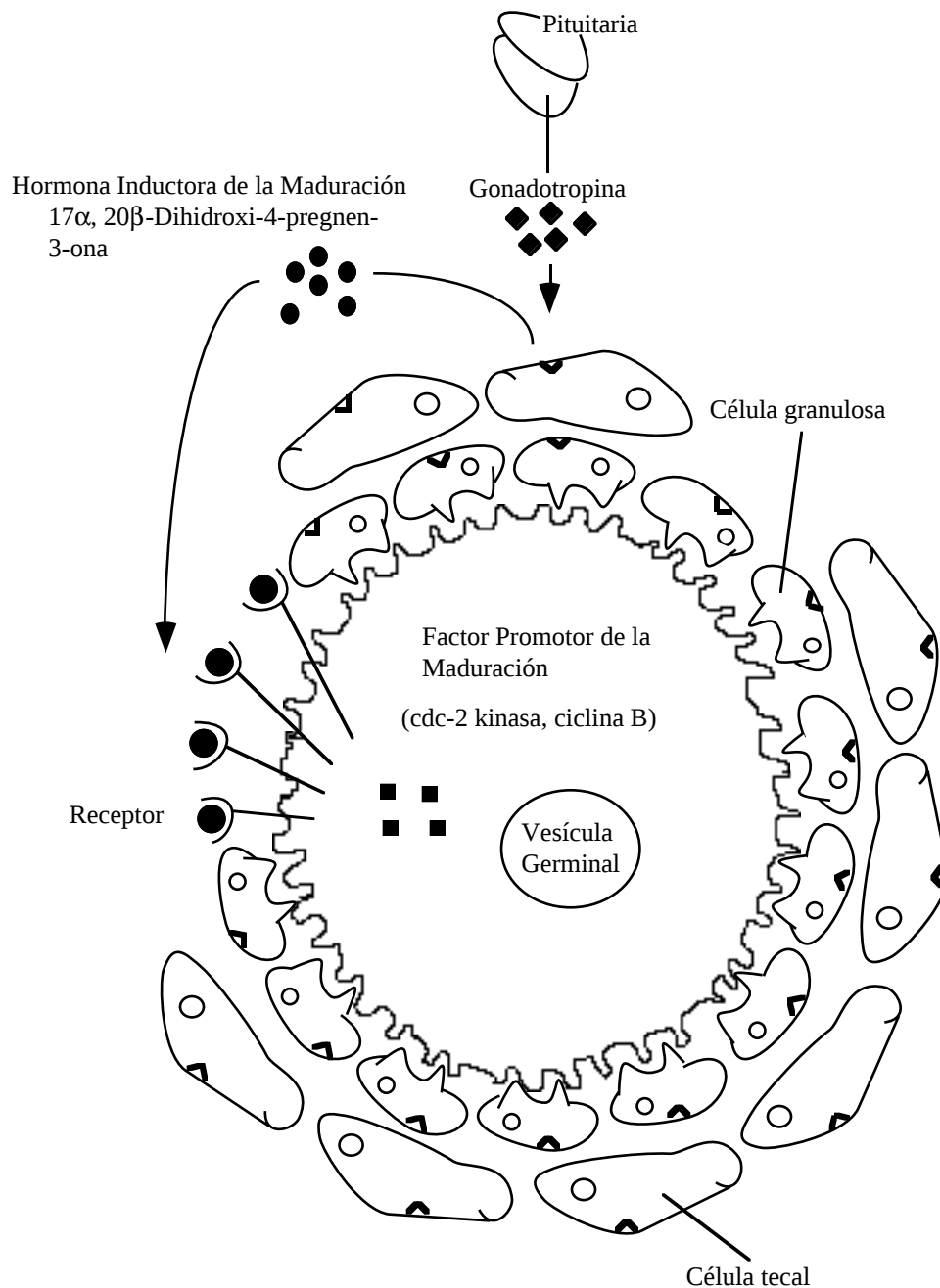


Fig. 6. Regulación hormonal de la maduración de los oocitos en los teleósteos (Después de Nagahama *et al.*, 1995).

Los mediadores hormonales que intervienen durante la maduración son: la GtH II, esteroides inductor de la maduración (MIS) y el factor promotor de la maduración (MPF) que actúan a nivel de la envoltura folicular, la membrana vitelina y el citoplasma de los oocitos respectivamente (Fig. 6) (Nagahama, 1994).

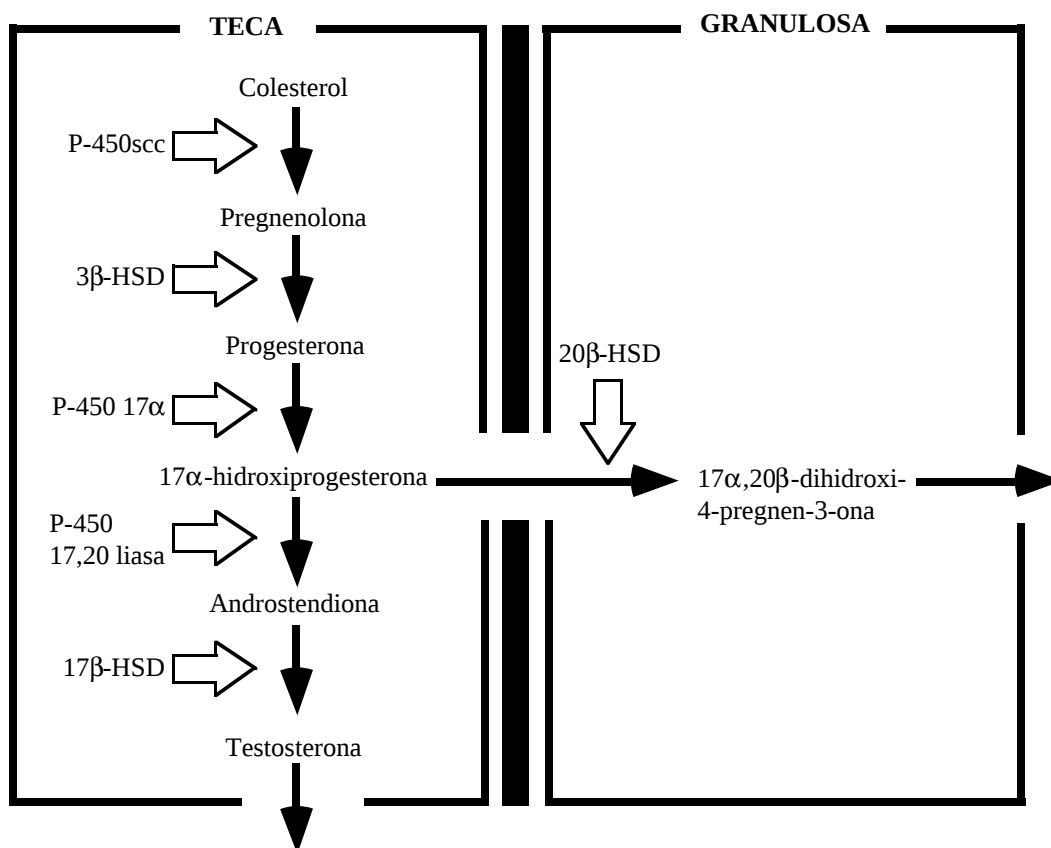


Fig. 7. Biosíntesis del 17 α , 20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona en el folículo de salmón (Después de Nagahama *et al.*, 1995). P-450 scc, Citocromo P-450 liberador de las cadenas laterales del colesterol; 3 β -HSD, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa-isomerasa; P-450 17 α , P-450 17 α -hidroxilasa; 17 β -HSD, 17 β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa; 20 β -HSD, 20 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Previo a la maduración las células foliculares adquieren la habilidad de producir MIS en respuesta a la GtH II (Nagahama, 1987). El principal MIS es el 17 α , 20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona, (17 α , 20 β DP) aunque se ha encontrado que el MIS del *Micropogonias undulatus* es el 17 α , 20 β , 21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona (Bromage y Roberts, 1995; Goetz, 1983; Nagahama *et al.*, 1995; Patiño, 1995; Thomas, 1994; Zohar, 1989). Para la formación del MIS intervienen ambas capas foliculares, la capa tecal produce a partir del colesterol el esteroide 17 α -hidroxiprogesterona que atraviesa la lámina basal y se adhiere

a la capa granulosa donde es convertido en 17α , 20β DP (Fig. 7) (Zohar, 1989).

La capacidad de la capa tecal de producir testosterona permanece, mientras que la actividad de aromatización por parte de la capa granulosa decrece lo que provoca que el folículo ovárico disminuya su capacidad de producir estradiol- 17β , obteniéndose elevados niveles de testosterona en el plasma que pueden estar involucrados, a través de retroalimentación positiva en la regulación de la producción y liberación de gonadotropina pre-ovulatoria (Nagahama, 1994; Zohar, 1989).

Durante la maduración, los oocitos intrafoliculares desarrollan la habilidad de sufrir GVBD en respuesta a la estimulación hormonal, proceso denominado competencia maduracional consiste en el incremento de la sensibilidad del oocito hacia ciertas hormonas y ocurre bajo el control de la GtH II (Nagahama, 1994; Patiño y Thomas, 1990 *fide* Nagahama *et al.*, 1995; Redding y Patiño, 1993; Thomas, 1994). La competencia maduracional está asociada con el incremento de receptores de MIS en el oocito (Liu y Patiño, 1993 *fide* Patiño, 1995) y el aumento de canales de unión del oocito con las células granulosas (Yoshizaki *et al.*, 1994 *fide* Patiño, 1995).

Un evento clave durante la maduración del oocito es la activación del MPF. El MPF está conformado por dos subunidades protéicas, una proteína con actividad kinasa y una proteína reguladora conocida como ciclina B (Redding y Patiño, 1993). La proteína kinasa cdc2 se encuentra presente en el citoplasma y para que la síntesis y activación del MPF se realice es necesario: 1) la síntesis de la ciclina B, proceso inducido por el MIS, 2) la formación del complejo kinasa cdc2-ciclina B, y 3) la fosforilación de la treonina de la kinasa cdc2 y de la serina de la ciclina B (Fig. 8) (Nagahama, 1994; Nagahama *et al.*, 1995). La función del MPF posiblemente es la de servir como un iniciador de la metafase en los oocitos (Nagahama *et al.*, 1995).

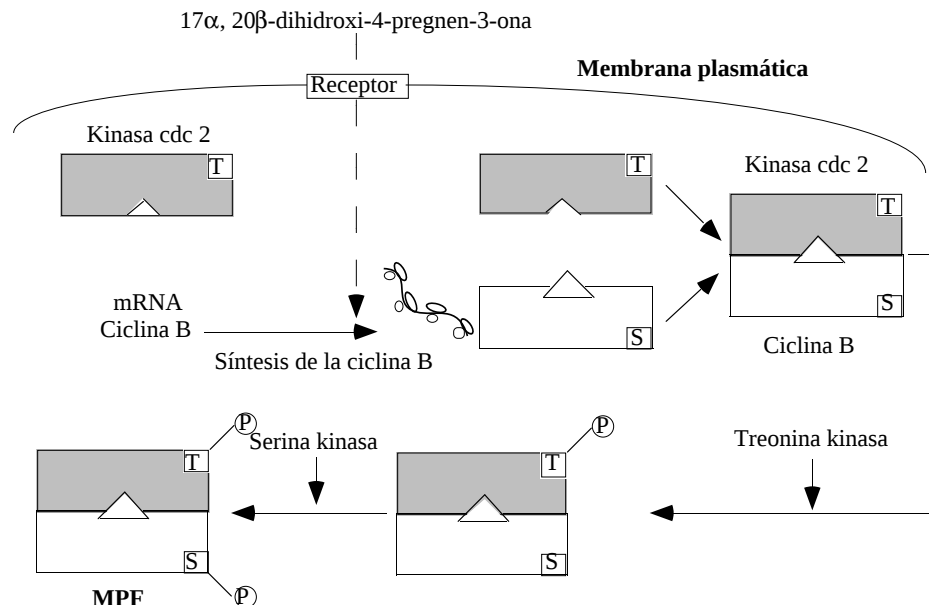


Fig. 8. Modelo de la formación y activación del factor promotor de la maduración (MPF) durante la maduración del oocito (Despuées de Nagahama *et al.* 1995). P, Fosforilación; S, Serina; T, Treonina.

Una vez concluida la maduración, se produce el fenómeno de ovulación, consistiendo en la expulsión del oocito maduro de su envoltura folicular. Durante éste proceso existe separación del oocito de la capa granulosa debido al fraccionamiento de las microvellosidades existentes entre ellos, formación de una abertura en la capa folicular provocada posiblemente por la acción de enzimas proteolíticas y contracción de células foliculares específicas provocando la expulsión del oocito a través de la abertura de la capa folicular (Goetz, 1983) hacia la cavidad ovárica, donde inicia la segunda división meiótica hasta llegar a la segunda metafase en donde se detiene la división (Nagahama, 1983; Zohar, 1989).

En la mayoría de los teleósteos, la ruptura folicular y separación del oocito es inducida por la GtH II que posiblemente actúa estimulando la producción de MIS, siguiendo el mismo mecanismo que para la maduración, pero con la diferencia que el sitio de acción de estas hormonas puede ser extrafolicular (Detlaff, 1988, Goetz *et al.*, 1991 *fide* Redding y Patiño, 1993). Otra hormona que actúa en la ovulación es la prostaglandina (PG), principalmente la PG $F_{2\alpha}$, secretada por el folículo ovárico, estimulando el proceso de contracción folicular (Donaldson y Hunter, 1983; Goetz, 1983; Nagahama, 1983; Zohar,

1989).

1.2.1.3. Espermatogénesis

La estructura testicular de la mayoría de los teleósteos es de tipo tubular y está conformada inicialmente por 3 tipos de células: las de Leydig ubicadas en la periferia, las de Sertoli ubicadas dentro de los túbulos y que separan a las espermatogonias en varios grupos (Fig 9).

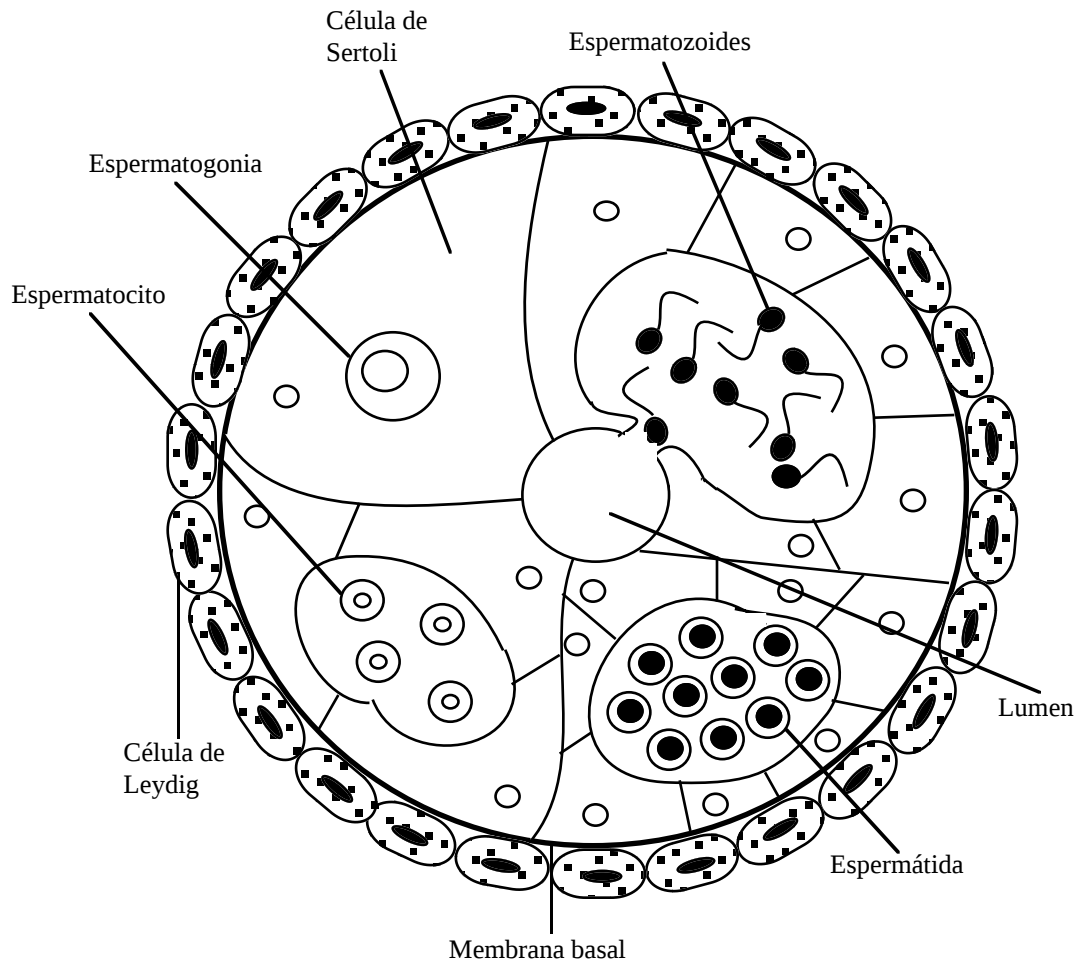


Fig. 9. Diagrama general del túbulo espermático, y esquema del desarrollo gonadal desde espermatogonia hasta espermatozoide (Después de Nagahama 1983)

El proceso de desarrollo de la espermatogonia para dar lugar a la formación de espermatozoides se denomina espermatogénesis, éste proceso se encuentra dividido en tres fases: meiosis, espermiogénesis y espermiación (Takashima e Hibiya, 1995).

La espermatogénesis inicia con la división mitótica de las espermatogonias primarias, dando lugar a las espermatogonias secundarias que mediante una nueva división mitótica dan origen a los espermatocitos primarios. Posteriormente los espermatocitos primarios sufren la primera división meiótica (Meiosis I) o división de reducción, originándose los espermatocitos secundarios que mediante la segunda división meiótica (Meiosis II) o de equitatividad dan origen a las espermátidas (Nagahama, 1983; Redding y Patiño, 1993, Takashima e Hibiya, 1995; Zohar, 1989).

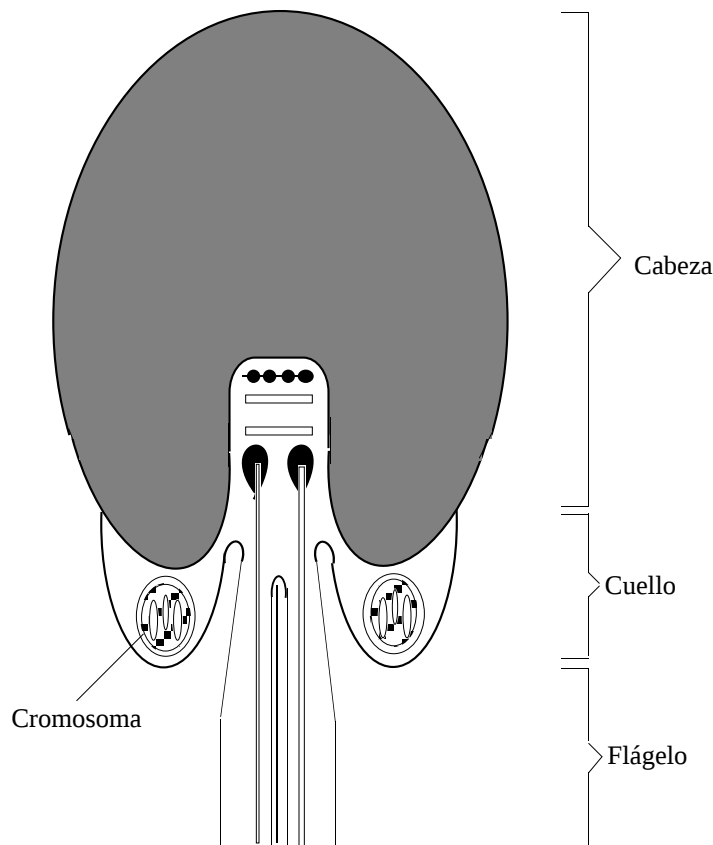


Fig. 10. Diagrama general del espermatozoide del salmón (Tomado de Takashima e Hibiya, 1995).

Las espermátidas mediante el proceso de diferenciación denominado espermiogénesis, dan lugar a los espermatozoides. La transformación involucra la elongación del núcleo, desarrollo de un flagelo y expulsión de citoplasma a través de la parte terminal del flagelo (Redding y Patiño, 1993). El producto final está conformado por una cabeza, un cuello y un flagelo. La cabeza es generalmente de forma esférica u oval y se diferencia del resto de

vertebrados por la ausencia del acrosoma, la misma que está involucrada en el proceso de fertilización. El cuello consiste en una porción del flagelo central rodeado de un corpúsculo formado por la fusión de varias mitocondrias (Fig. 10) (Nagahama, 1983; Takashima e Hibiya, 1995).

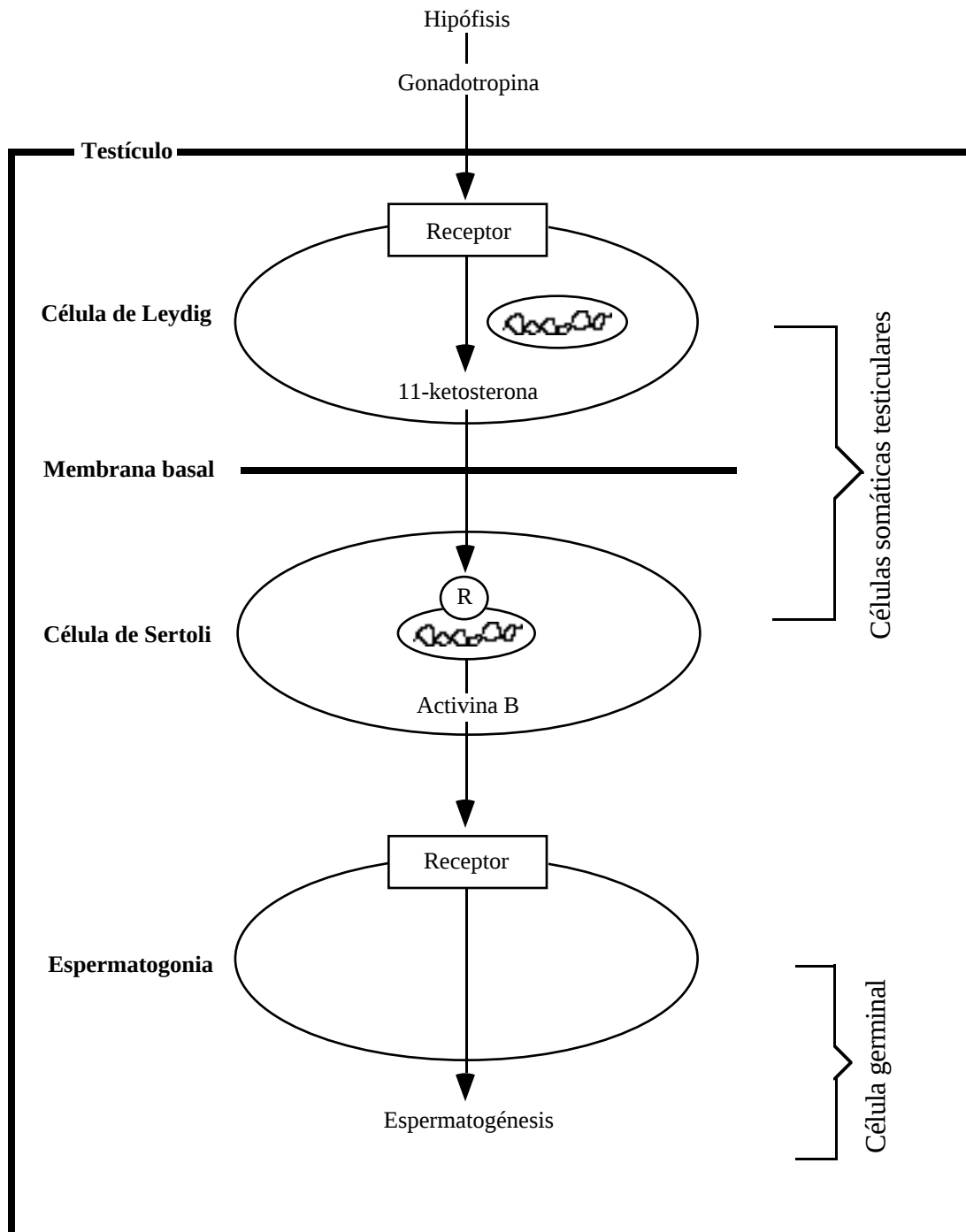


Fig. 11. Regulación hormonal de la espermatogénesis en el testículo de la anguila (Después de Nagahama, 1994).

La actividad esteroideogénica de las gónadas masculinas se encuentra regulada principalmente por la GtH II. Las células esteroideogénicas que intervienen en la producción de andrógenos son las de Leydig y las de Sertoli (Fostier *et al.*, 1983; Pudney y Callard, 1984 *fide* Reeding y Patiño, 1993). Durante las primeras fases de la espermatogénesis, la gonadotropina estimula a las células de Leydig a producir 11-ketosterona, hormona que activa a las células de Sertoli a producir activina B y que a su vez actúa sobre las espermatogonias regulando el proceso de espermatogénesis y espermiogénesis (Fig. 11) (Fostier *et al.*, 1983; Matty, 1985; Nagahama, 1994).

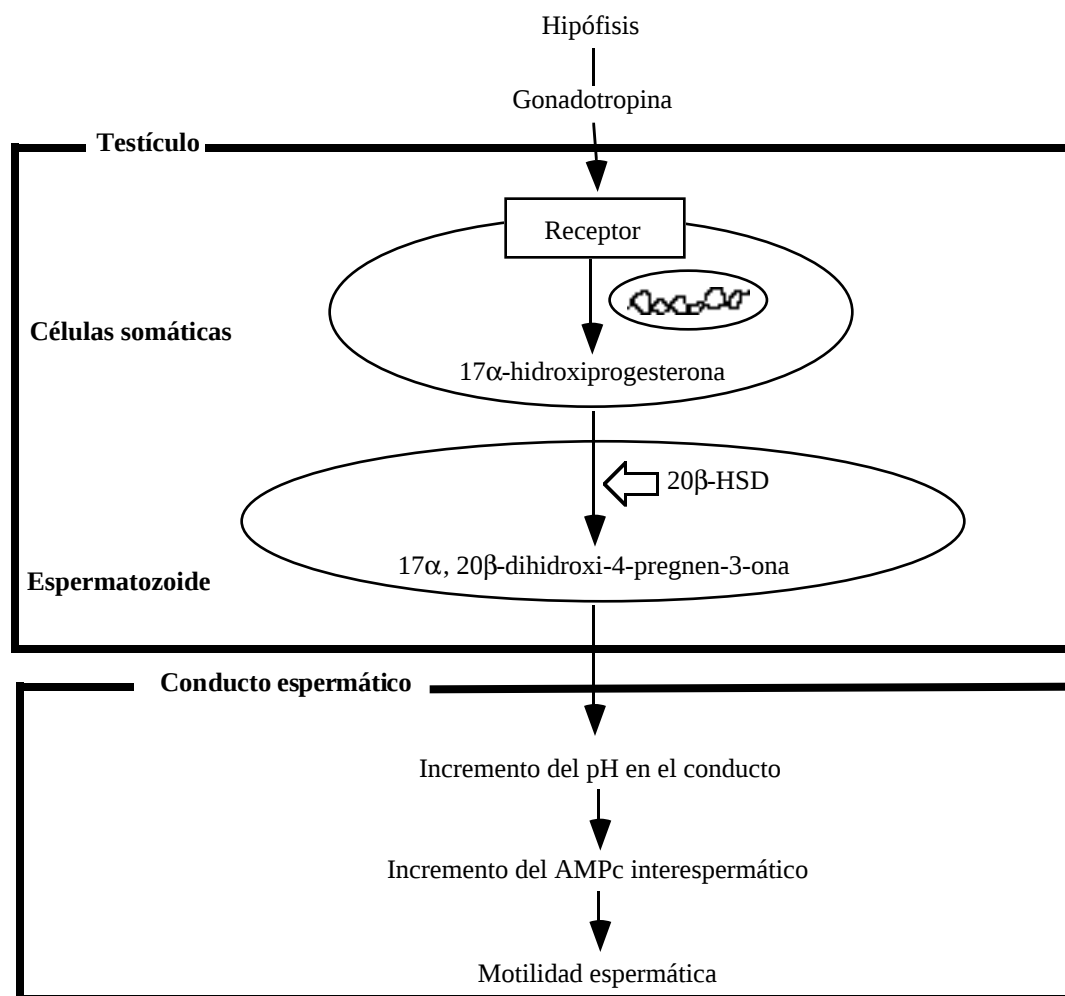


Fig. 12. Regulación hormonal de la motilidad espermática en salmónidos (Después de Nagahama, 1994). 20β-HSD, 20β-hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Luego de que la espermiogénesis es completada, toma lugar la espermiación consistente en la expulsión de espermatozoides hacia los vasos deferentes del tracto genital donde son

almacenados y adquieren motilidad (Nagahama, 1983; Takashima e Hibiya, 1995; Zohar, 1989).

La espermiación se encuentra influenciada por la hormona $17\alpha, 20\beta$ DP, producida por el espermatozoide a partir del esteroide precursor 17α -hidroxiprogesterona sintetizado por las células somáticas en respuesta a la gonadotropina. La función del $17\alpha, 20\beta$ DP es el de incrementar el pH del conducto espermático, lo que influye de manera positiva en la síntesis de AMP cíclico que interviene en la adquisición de motilidad por parte de los espermatozoides (Fig. 12) (Nagahama, 1994).

1.2.2. Inducción del desarrollo gonadal por administración de hormonas exógenas

Existen especies, que a causa del estrés fisiológico producido por el cautiverio no se reproducen, debido a la inhibición de la producción y liberación de las hormonas sexuales estimulantes del desarrollo gonadal.

Bajo condiciones naturales, el ciclo reproductivo de los peces se inicia cuando se producen cambios específicos en el medio ambiente. Los factores de tipo exógeno que influyen sobre el ciclo reproductivo son: temperatura, fotoperíodo, oxígeno disuelto, pH, salinidad, feromonas, sustrato de desove, lluvias, ciclo lunar, factores sociales. Siendo los factores que mayor influencia ejercen:

1) Fotoperíodo: es crítico en especies que habitan en altas o bajas latitudes, donde el fotoperíodo es variable a lo largo del año y la ovulación se encuentra sincronizada con estos cambios. En especies que desovan en primavera o a inicios del verano, el desarrollo gonadal es estimulado por largos fotoperíodos generalmente combinados con elevadas temperaturas, éste fenómeno ha sido demostrado en el medaka japonés (*Oryzias latipes*), pez mosquito (*Gambusia affinis*), pez dorado (*Carassius auratus*). Por el contrario, las especies que desovan en otoño o principios de invierno, un fotoperíodo corto a menudo

favorece su ciclo reproductivo como en el caso de los salmónidos y el ayu (*Plecoglossus altivelis*) (Lam, 1983; Stacey, 1984).

2) Temperatura: parámetro que juega un rol importante en el ciclo sexual de especies que habitan en áreas tropicales principalmente. Bajas temperaturas favorecen la formación de espermatocitos primarios y la vitelogénesis, mientras que elevadas temperaturas inducen una proliferación espermatogonial, espermiación, maduración y ovulación en especies tales como *Fundulus heteroclitus*, *Fundulus confluentus* y pez luna (*Enneacanthus obesus*); observándose lo contrario en el *Phoxinus laevis* y *Couesius aggregata*. La temperatura puede ejercer sus efectos en: a) la secreción de gonadotropina de la pituitaria; b) la degradación metabólica de las hormonas; c) la respuesta del hígado a los estrógenos en la producción de vitelogenina; d) la respuesta de las gónadas a la estimulación hormonal (Lam, 1983; Stacey, 1984).

3) Sustrato de desove: la importancia del sustrato de desove en la regulación de la ovulación, está influenciada por la especificidad de los requerimientos de sustrato y su distribución espacio-temporal. Así por ejemplo, la presencia de vegetación acuática estimula la respuesta ovulatoria de peces cuyos huevos son del tipo adhesivos tales como el pez dorado (*Carassius auratus*), bagre del canal (*Ictalurus punctatus*) y carpa común (*Cyprinus carpio*) (Lam, 1983; Stacey, 1984).

4) Feromonas: existen señales químicas que ayudan a que se desarrolle normalmente el ciclo reproductivo de algunas especies. Estas señales se transmiten en el medio a través de sustancias químicas llamadas en general semioquímicos, que interactúan entre individuos de diferente especie siendo conocidas en éste caso como alomonas ó si la interacción ocurre entre individuos de la misma especie son conocidas como feromonas (Liley y Stacey, 1983; Stacey, 1984; Matty, 1985).

Las feromonas son esteroides tales como la testosterona, estrógenos, 11 ketosterona y prostaglandinas, producidos por las gónadas, cuando son liberadas al agua a través de la

orina o de los productos sexuales, son percibidos por los receptores olfatorios o gustativos de individuos del sexo opuesto logrando su atracción e induciendo el comportamiento sexual, permitiendo sincronizar la actividad sexual e incrementando la razón de fertilización de los huevos desovados (Matty, 1985).

El desarrollo gonadal puede ser controlado por la manipulación de los factores ambientales anteriormente mencionados. Sin embargo, debido a los elevados costos que implica la adaptación y mantenimiento de un sistema que controle éstas variables, el más práctico y confiable método de control sobre dicho proceso consiste en el uso de químicos exógenos como hormonas que estimulan el normal desarrollo gonadal (Harvey y Hoar, 1979).

El tratamiento hormonal tiene los siguientes objetivos:

- 1) Obtener gametos de una especie en una época diferente a la de su reproducción natural en el medio ambiente, alargando el período de disponibilidad de alevines.
- 2) Mejorar la planificación de la producción, gracias a la sincronización de grupos de reproductores para ovular y espermiar en épocas predeterminadas.
- 3) Obtener elevados porcentajes de fecundidad y sobrevivencia de alevines.

Existen varios niveles dentro del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en los cuales se puede intervenir a través de la administración de compuestos hormonales específicos que actúan conjuntamente con hormonas propias del individuo (Fig. 13).

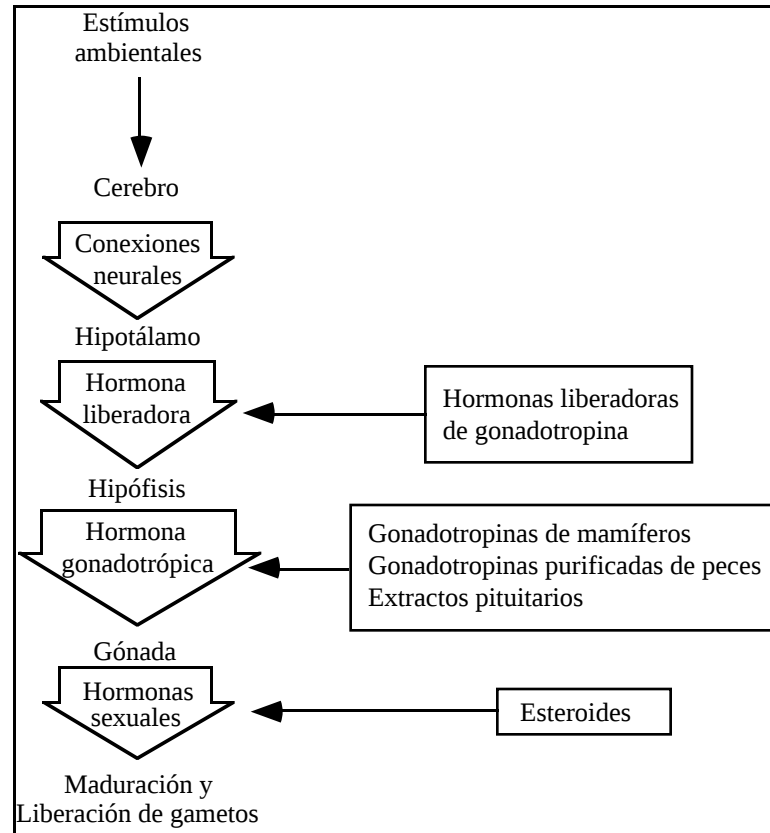


Fig. 13. Resumen de las hormonas exógenas utilizadas para inducir la maduración y desove en los teleósteos y nivel de acción (Después de Harvey y Hoar, 1979).

1.2.2.1. Extractos pituitarios

La inducción por hormonas exógenas del desove de peces en cautiverio, tuvo sus inicios en los años 30 con el desarrollo del método conocido como hipofisación, que involucra la utilización de suspensiones ó concentrados de glándulas hipófisis por su contenido de gonadotropina (Patiño, 1995).

El primer ensayo fué realizado en Argentina por Bernardo Houssay en 1931, en el cual se suministró mediante inyecciones intraperitoneales extractos de hipófisis de *Prochilodus platensis* en el bagre (*Cnesterodon platensis*), con la finalidad de obtener ovulación. El método fue perfeccionado por Rodolfo von Ihering, quien en el año de 1934 en colaboración con Azevedo logró el desove en cautiverio del curimbata (*Prochilodus argenteus*) en Brasil (Donaldson y Hunter, 1983; Matty, 1985).

Durante esta época, en la ex-Unión Soviética se utilizaban hipófisis de mamíferos para tratar de inducir el desove del esturión (*Acipenser stellatus*) sin resultados positivos. No fue hasta 1937 que Gerbil'skii logró su desove utilizando extractos pituitarios de la misma especie logrando su desove. Sin embargo, es en 1950 que la técnica fue ampliamente establecida, utilizándose en una gran variedad de especies como: carpa negra (*Mylopharyngodon piceus*), carpa cabezona (*Aristichthys nobilis*), carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), armura (*Ctenopharyngodon idellus*), *Catla catla*, *Labeo rohita*, *Cirrinhus mrigala*, carpa común (*Cyprinus carpio*), mandí (*Pimelodus clarias*), piavá (*Leporinus* sp.), curimbatá (*Prochilodus* sp.), bagre sapo (*Rhamdia quelen*), pacu (*Colossoma mitrei*), cachama (*Colossoma macropomun*), pámpano (*Mylossoma* sp.) (Matty, 1985; Luchini, 1990; Sheperd y Bromage, 1988).

La metodología de la hipofisación varía entre especies y estudios a realizar, generalmente relacionado con el protocolo de preparación de los extractos pituitarios, la dosis a inyectar y el número e intervalo de inyecciones. Dos inyecciones son administradas, una dosis inicial en la cual se aplica el 10% de la dosis total, 24 horas posteriores a la administración de la dosis inicial se aplica una dosis final que comprende el 90% de la dosis total (Zohar, 1989).

Hasta mediados de la década de los 70, la inducción estaba limitada a la hipofisación. Sin embargo, la técnica presenta varias desventajas: 1) Falta de estandarización de las dosis utilizadas, por cuanto las hipófisis son tomadas de peces con grado variable de madurez sexual, reflejándose en la variación de la potencialidad de los extractos utilizados; 2) Presencia de otras hormonas en la hipófisis, causa efectos delectéreos, inhibiendo o modificando el efecto de las gonadotropinas; 3) Se necesita una gran cantidad de peces donantes con menor o igual valor comercial que los reproductores a ser inducidos y 4) En el caso de utilizar pituitarias heteroplásticas el pez al que se las suministra, genera anticuerpos contra la gonadotropina inicialmente inyectada, lo que reduce considerablemente la efectividad de subsecuentes hipofisaciones, llegando incluso a ser

totalmente inactivada la hormona por la reacción inmunitaria del pez (Donaldson y Hunter, 1983).

A partir de 1970 se recurrió a la utilización de nuevas técnicas, que comprenden la purificación de la gonadotropina y la síntesis de nuevos derivados hormonales, actuando a un nivel superior ó inferior al de la gonadotropina en el control hormonal del desarrollo gonadal (Nagahama, 1983).

1.2.2.2. Gonadotropinas purificadas de peces

La falta de estandarización de los métodos de hipofisación generó grandes esfuerzos para purificar las hormonas gonadotropas de la hipófisis de peces. Desde 1970 se viene produciendo gonadotropina purificada de peces, debido a que estos compuestos presentan una mayor efectividad que los extractos de pituitaria en inducir la ovulación y espermiación de los peces en cautiverio.

Gonadotropinas purificadas o parcialmente purificadas han sido obtenidas a partir de las siguientes especies: carpa común (*Cyprinus carpio*), salmones (*Oncorhynchus tshawytscha*, *Oncorhynchus keta*, *Oncorhynchus gorbuscha*), bagre (*Heteropneustes fossilis*), tilapias (*Oreochromis mossambicus*, *Sarotherodon spirilus*), lenguado (*Pseudopleuronectes americanus*) y anguila (*Muraenesox cinereus*) (Donaldson y Hunter, 1983).

Sin embargo, la alta especificidad biológica de las hormonas gonadotropas, ocasiona que la hormona de una especie no tenga los efectos esperados sobre el proceso reproductor de otra especie.

Una de las principales desventajas que presentan estos compuestos es su elevado costo de purificación, por lo que únicamente una preparación parcialmente purificada de gonadotropina del salmón del pacífico (*Oncorhynchus* sp.), SG-G100, se expende

comercialmente. Esta hormona ha sido utilizada para inducir la ovulación y espermiación del pez dorado (*Carassius auratus*), bagre (*Heteropneustes fossilis*), lisa (*Mugil cephalus*), ayu (*Plecoglossus altivelis*), sabalote (*Chanos chanos*), lenguado japonés (*Limanda yokohamae*), pacu (*Colossoma mitrei*), salmones (*Oncorhynchus kisutch*, *Oncorhynchus tshawytscha*) (Donaldson y Hunter, 1983).

Este tipo de compuestos se utilizan mayormente en procesos de investigación por presentar las siguientes ventajas:

- 1) Son más o menos libres de otras hormonas pituitarias.
- 2) Puede ser almacenada por varios años sin perder su actividad.
- 3) Presenta una potencialidad estandarizada.

1.2.2.3. Esteroides

La acción que ejerce la gonadotropina sobre el proceso de maduración gonadal es por medio de esteroides secretados por la envoltura folicular. Con base en este conocimiento se han realizado estudios a fin de determinar la factibilidad de inducir la maduración, ovulación y espermiación con esteroides, eliminando la utilización de precursores hormonales como la gonadotropina y la hormona liberadora (Harvey y Hoar, 1979).

Los compuestos hormonales con los que se está trabajando a nivel de investigación son: Progesteronas (17α -hidroxiprogesterona y 17α -hidroxi-20 β -dihydroprogesterona), Corticoesteroides (11-deoxycorticosterona, 11-deoxycortisol, cortisol, cortisona), estrógenos (estradiol- 17β) y andrógenos (metiltestosterona, 11-ketosterona) (Donaldson y Hunter, 1983).

De los resultados obtenidos al aplicar estos compuestos en coho salmón (*Oncorhynchus kisutch*), trucha arcoiris, carpa (*Ciprinus carpio*), lucio (*Esox lucios*), bagre africano

(*Clarias lazera*), pez dorado (*Carassius auratus*) y tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) se estableció que es necesario la combinación de gonadotropinas exógenas con esteroides para que estos últimos actúen en el desarrollo gonadal (Donaldson y Hunter, 1983; Zohar, 1989). Esto se debe a que las gonadotropinas exógenas aumentan la sensibilidad de los oocitos hacia los esteroides permitiendo que éstos ejerzan su función.

Un segundo método de acción de los esteroides, es a través del control retroinformativo de la secreción de gonadotropina. La liberación de la gonadotropina se encuentra regida por un sistema negativo de retroinformación, en el cual el *nucleus lateralis tuberis* del hipotálamo y el *pars distalis proximalis* de la hipófisis responden al nivel de esteroides gonadales en circulación, inhibiéndose la producción de GnRH cuando existe un elevado nivel de esteroides en circulación, provocando la disminución de la síntesis y secreción de gonadotropina. Por esta razón se han realizado estudios que permitan la inducción al desove mediante el uso de compuestos denominados antiestrógenos, que compitan con los esteroides gonadales endógenos para fijar sitios en la hipófisis y el hipotálamo, liberando gonadotropina independientemente del nivel de esteroides en el plasma. Los antiestrógenos ensayados son citrato de clomifeno, taxomifeno y ciclofenil, con los cuales se ha logrado ovulación en el pez dorado (*Carassius auratus*), *Heteropneustes fossilis*, *Misgurnus anguillicaudatus*, carpa (*Cyprinus carpio*).

Los resultados obtenidos con estos compuestos son insuficientes para ser utilizados en tratamientos de inducción al desove de especies de significancia económica, por lo que su uso aún se encuentra en fase experimental (Harvey y Hoar, 1979; Donaldson y Hunter, 1983).

1.2.2.4. Gonadotropinas de mamíferos

Este tipo de gonadotropinas son de origen pituitario (hormona luteinizante y hormona folículo estimulante) ó placentario (gonadotropina coriónica humana) (Donaldson y

Hunter, 1983).

El mecanismo de acción de éstas hormonas consiste en dirigirse a las gónadas actuando sinérgicamente con las gonadotropinas propias del pez, para inducir a la producción de esteroides sexuales que son los mediadores directos del desarrollo gonadal (Harvey y Hoar, 1979; Matty, 1985).

De las hormonas anteriormente mencionadas la que mejores resultados ha reportado es la HCG, glicoproteína producida por la placenta y que se encuentra en grandes cantidades en la orina de la mujer durante los primeros meses del embarazo lo que permite su fácil obtención para fines comerciales; el efecto de esta hormona en el ser humano es el de estimular al cuerpo lúteo para que produzca esteroides sexuales, tales como progesterona que actúa por medio de una vía de retroalimentación negativa sobre la hipófisis, inhibiendo la producción de la Hormona Luteinizante, responsable de la ovulación y por lo tanto manteniendo el embarazo (Murad y Haynes, 1981).

La HCG presenta la ventaja de ser adquirida fácilmente en laboratorios farmacéuticos como un producto comercial con una cantidad estandarizada de gonadotropina (Donaldson y Hunter, 1983; Matty 1985). Esta sustancia ha sido utilizada para inducir el desove en numerosas especies: mandí (*Pimelodus clarias*), curimatá (*Prochilodus* sp.), bocachico (*Prochilodus reticulatus*), sábalo (*Prochilodus platensis*), dorado (*Salminus maxillosus*), dorada (*Brycon moorei*), chame (*Dormitator latifrons*) (Luchini, 1990).

En el robalo la HCG ha sido empleada desde el año 1974. El primer ensayo fue realizado por Florida Game and Fresh Water Fish Commission en el período comprendido entre 1974 a 1981 con la especie *C. undecimalis*. En este estudio se emplearon dosis hormonales de HCG de 1100 U.I. HCG.Kg⁻¹ de reproductor, obteniéndose ovulación 30-40 horas después de aplicar la inyección, en el 60% de las hembras inducidas (Chapman *et al.*, 1982). Otros intentos de desove en cautiverio de esta misma especie fueron realizados en Brasil por Costa (1981 *vide* Nogueira, 1991), las dosis utilizadas estuvieron

en el rango de 150 a 1000 U.I. HCG.Kg⁻¹ de reproductor, con las que se tuvo respuestas satisfactorias por parte de éstas cuando la dosis fue 500-1000 U.I. HCG.kg⁻¹ obteniendo desoves 24-30 horas después de la inducción.

Otra especie de robalo con la que se ha intentado obtener reproducción en cautiverio es el *Centropomus parallelus*, Cerqueira en 1991 trabajó con individuos cuyo peso oscilaba entre 120 y 1850 g utilizando dosis de HCG de 1500 U.I. HCG.hembra⁻¹ y 500-1500 U.I. HCG.macho⁻¹ obteniendo ovulación 40 horas después de aplicada la inyección en el 70% de las hembras.

1.2.2.5. Hormonas liberadoras de gonadotropina

El descubrimiento de que la producción y liberación de una gonadotropina (Hormona Luteinizante) de la pituitaria es controlada en los mamíferos por una hormona que se origina en el hipotálamo, creó una nueva ruta de investigación para el control de la reproducción de los teleósteos (Donaldson y Hunter, 1983; Harvey y Hoar, 1979).

En el año de 1971 se aisló y caracterizó éste compuesto denominándosele Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante (LHRH). Esta hormona es un decapeptido en cadena lineal que presenta en su estructura química 10 aminoácidos esenciales (Schally, 1978 *fide* Donaldson y Hunter, 1983).

Actualmente se ha descubierto la existencia de 9 tipos diferentes de Hormonas Liberadoras de la Gonadotropina en vertebrados. Estas hormonas difieren principalmente en el aminoácido presente en la posición 5, 7 y 8 (Fig.14).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Mamífero	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	Gly	NH2
Pollo I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	Gly	NH2
Pez gato	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	Gly	NH2
Salmón	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly	NH2
Escualo	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	Gly	NH2
Pollo II	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Try	Pro	Gly	NH2
Dorada	pGlu	His	Trp	Ser	Thr	Gly	Leu	Ser	Pro	Gly	NH2
Lamprea III	pGlu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	Gly	NH2
Lamprea I	pGlu	His	Tyr	Ser	Leu	Glu	Trp	Lys	Pro	Gly	NH2

Fig. 14. Estructuras primarias de GnRHs aisladas del cerebro de los vertebrados. Los recuadros indican regiones conservadas (Tomado de Carrillo, 1997).

La LHRH ha sido empleada en inyecciones para inducir la ovulación de teleósteos tales como el ayu (*Plecoglossus altivelis*), pez dorado (*Carassius auratus*), armura (*Ctenopharyngodon idelus*), carpa (*Hypophthalmichthys molitrix*), *Megalobrama ambylocephala*, carpa manchada (*Aristichtys nobilis*), carpa negra (*Mylopharyngodon piceus*), medaka japonés (*Oryzias latipes*), lenguado japonés (*Limanda yokohamae*), gobio (*Acanthogobius flavimanus*), carpa común (*Ciprinus carpio*), tenca (*Tinca tinca*), salmón del pacífico (Donaldson y Hunter, 1983).

La LHRH sufre degradación enzimática por lo que su vida media es menor a 30 minutos; debido a este problema, se intentó obtener compuestos sintéticos análogos que presenten un tiempo mayor de permanencia en el organismo.

El primer análogo sintetizado fue el des-Gly¹⁰-LHRH (1-9) etilamida, posteriormente la sustitución de la posición 6 con D-Alanina dió origen al análogo D-Ala⁶ LHRH. Con la combinación de estas dos sustituciones se obtuvo al análogo D-Ala⁶, des Gly¹⁰-LHRH (1-9) etilamida (Fig.15) (LHRHa D-Ala⁶). A partir del LHRHa D-Ala⁶ se sintetizaron

nuevos análogos al sustituir la posición 6 por D-serina (Bu^t) (Fig. 15) o D-Triptófano (Donaldson y Hunter, 1983).

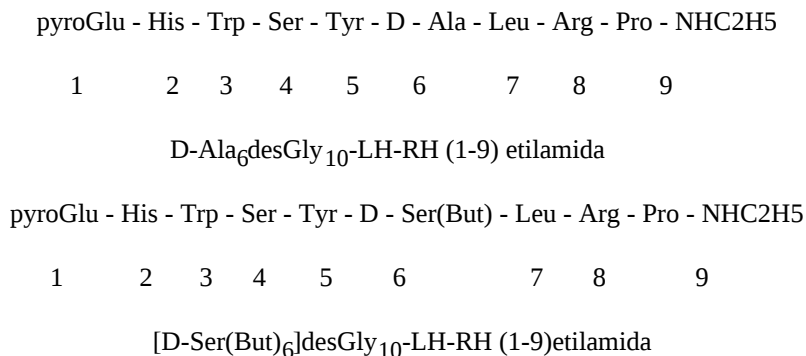


Fig. 15. Conformación estructural de 2 compuestos análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (Tomado de Nagahama, 1983).

Otros análogos sintetizados a partir de la hormona liberadora de la gonadotropina del salmón son [D-Arg⁶-Pro⁹-NET]-sGnRH, [D-Ala⁶-Pro⁹-NET]-sGnRH y [(imBz)-D-His⁶-Pro⁹-NET]-sGnRH (Zohar, 1989).

Estos nuevos compuestos presentan una actividad biológica 30-50 veces mayor que el LHRH por tener una lenta degradación in vivo y por poseer una mayor afinidad con los receptores específicos de la hipófisis (Zohar, 1989)

Inicialmente la administración de estas sustancias era realizada mediante inyecciones, logrando la secreción de gonadotropina por 48 horas aproximadamente, tiempo insuficiente para inducir la ovulación de hembras que no han alcanzado las etapas finales de la vitelogénesis. Por lo tanto fue necesario aplicar 2 o más inyecciones a los reproductores para obtener su ovulación (Donaldson y Hunter, 1983).

Con la finalidad de evitar la excesiva manipulación de los animales, se buscaron nuevos métodos alternativos que permitan una liberación controlada y continua de la hormona en el sistema circulatorio. Estos métodos se basan en la utilización de pellets de colesterol o colesterol-celulosa, pellets de copolímeros biodegradables de ácido poliláctico-poliglicólico (PLPG) o acetato de etileno-vinil (EVAc), lográndose con ellos una difusión

gradual y constante de la hormona por un período mayor de tiempo (Zohar, 1989; Zohar *et al.*, 1990)

Otra hormona que actúa en ciertos teleósteos en la producción y liberación de gonadotropina junto con la hormona liberadora de la gonadotropina, es el factor inhibidor de la liberación de gonadotropina. Estudios realizados con el pez dorado han determinado que éste factor es la dopamina. Así también ensayos con compuestos antagonistas a la dopamina, tales como el pimozide han obtenido ovulación en el pez dorado al combinarlo con LHRHa D-Ala⁶ (Donaldson y Hunter, 1983). Sin embargo, el uso de estos compuestos se encuentra en su fase experimental.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 REPRODUCTORES

2.1.1 Obtención

Los reproductores de robalo utilizados en los experimentos fueron capturados mediante redes de cerco o chinchorros (Tabla 1).

La selección de animales aptos para ser mantenidos en cautiverio se basó en su condición física, es decir, se escogieron aquellos que no presentaban lesiones graves tales como pérdida excesiva de escamas o ulceraciones en el abdomen.

Una vez seleccionados los animales, su transporte a las instalaciones del CENAIM se realizó en un tanque de 350 l equipado con un tanque de oxígeno, siendo necesaria la adición de anestésico (MS-222) al agua para que los animales se mantengan tranquilos y no se golpeen con las paredes del tanque durante el transcurso del viaje.

Tabla 1. Captura de reproductores de robalo

N.-	Sexo	Fecha de captura	Zona de captura
1	F	05/05/93	Ayampe-Puerto López
2	F	05/05/93	Ayampe-Puerto López
3	M	05/05/93	Ayampe-Puerto López
4	F	05/05/93	Ayampe-Puerto López
5	F	05/05/93	Ayampe-Puerto López
6	M	12/05/93	San Pedro
7	M	12/05/93	San Pedro
8	M	12/05/93	San Pedro
9	F	06/12/94	San Pedro
10	F	06/12/94	San Pedro
11	F	06/12/94	San Pedro
12	F	28/12/96	San Pedro
13	M	13/01/97	San Pablo

F: Femenino

M: Masculino

2.1.2 Aclimatación

Una vez que los robalos llegaron al laboratorio se pesó y midió su longitud total, posteriormente fueron sometidos a un tratamiento profiláctico a base de oxitetraciclina y nitrofurazona en dosis de 50 ppm por una hora durante tres días continuos y en el caso de encontrarse parásitos externos se sometió a los reproductores a un tratamiento con agua dulce por 5-7 min.

Luego del tratamiento los ejemplares fueron transferidos a tanques de 1 TM permaneciendo en cuarentena por 2-3 días.

2.1.3. Marcación

Para su posterior reconocimiento los ejemplares fueron marcados, utilizándose para este propósito el sistema CWT (Coded Wire Tag). En este método se utiliza una pistola que introduce a presión hilos metálicos dentro de la musculatura del animal, para determinar la localización del implante se emplea un detector de metales con una señal óptica que se activa cuando la marca es localizada, lo que permite la identificación del reproductor.

2.1.4. Mantenimiento

Los tanques utilizados para mantener a los animales fueron los siguientes:

- Un tanque circular exterior de 10 TM de capacidad. El recambio diario de agua fue del 290% y se lo realizó a través de un flujo continuo de agua a razón de 20 l.min^{-1} . En este tanque se ubicó al primer grupo de reproductores conformado por los animales No. 1, 4, 5, 7, 8 y 10.

- Un tanque ovalado de fibra de vidrio de 18 TM de capacidad, localizado en el área de maduración de camarones del CENAIM (Fig. 16). El tanque posee un sistema de recirculación continua de agua constituido por un filtro de grava de 1,5 TM de capacidad,

una unidad de luz ultravioleta (U.V.) y una bomba acoplada a un calentador de agua que permitió mantener la temperatura del agua entre 26 y 29 °C. En este tanque se transfirió al segundo grupo de reproductores conformado por los animales No. 2, 3, 6, 9, 11, 12 y 13.

En el área de maduración de camarones se estaba realizando al mismo tiempo un bioensayo con camarones, en el cual se utilizaba un fotoperíodo diferente al requerido para los robalos; debido a esto, se efectuó una división del ambiente utilizando cortinas plásticas, para evitar la incidencia de luz proveniente de los tanques con camarones durante la noche.

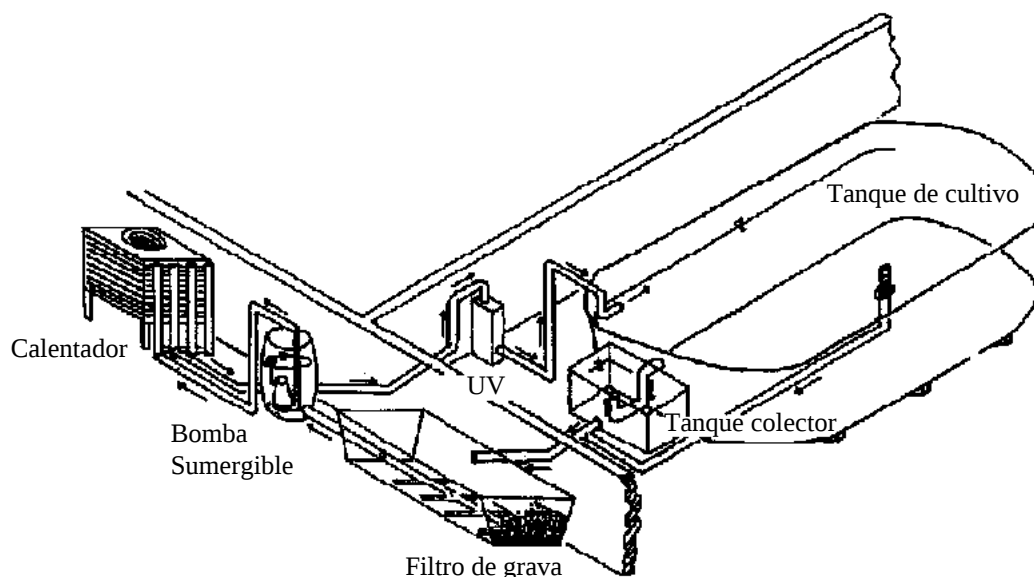


Fig. 16. Diagrama del tanque de robalos ubicado en el área de maduración de camarones del CENAIM. UV, unidad de luz ultravioleta

En las mañanas se midió: temperatura, oxígeno disuelto y pH en ambos tanques con la finalidad de conocer en qué condiciones medioambientales se encontraban los animales en cautiverio.

2.1.5. Alimentacion

Los robalos fueron alimentados con pescado (sardina, botellita, morenilla, sardinilla) a razón del 1% de la biomasa total existente en cada tanque. Al alimento se le adicionó un

compuesto suplementario a razón de 0,06% de la biomasa de reproductores existente en el tanque; la mezcla constituida por harina de trigo (40%), vitamina C (8%), vitamina B1 (2%), vitamina E (4%), agua (10%) y emulsión enriquecedora de ácidos grasos esenciales (36%).

Las dosis de alimento eran suministradas una vez al día en horas de la tarde.

2.2. HORMONAS

Para tener reproducción en cautiverio se recurrió a la utilización de hormonas exógenas para estimular el desarrollo gonadal de los peces. Las hormonas utilizadas fueron la HCG y la LHRHa.

2.2.1. HCG (Gonadotropina Coriónica Humana)

La hormona HCG empleada fué la denominada comercialmente Puberogen, que se presenta en ampollas que contienen 5.000 U.I. de HCG.

2.2.2. LHRHa (Luteinizing Hormone Releasing Hormone Ethylamide)

La hormona LHRHa empleada fue la des-Gly¹⁰,[D-Ala⁶], estructura química : P-GLU-HIS-TRP-SER-TYR-D-ALA-LEU-ARG-PRO-NH-ET.

Para asegurar la administración constante de la hormona por 2-3 semanas se prepararon pellets en base al colesterol que contienen la hormona.

Los pellets fueron elaborados en el CENAIM mediante la técnica suministrada por el Dr. Goro Yoshizaki (com. pers.). A continuación se describe el procedimiento:

- Pesar 2 mg de LHRHa y disolver en 200 µl de una solución de etanol al 50%. Se utiliza etanol por cuanto la hormona tiene una elevada solubilidad en éste compuesto y permite

una distribución homogénea al mezclarlo con el colesterol.

- La solución hormonal previamente obtenida se dispersa en 250 mg de colesterol que le sirve como medio de transporte a la hormona y se homogeniza con mortero.
- Luego del homogenizado se deja secar la mezcla por 2-3 horas para que se evapore el alcohol y la hormona quede adherida a la superficie de las partículas de colesterol.
- Posteriormente se añade 50 mg de manteca de cacao líquida y se homogeniza nuevamente. La función de la manteca de cacao es permitir la compactación de los pellets y liberar lenta y constantemente la hormona una vez que el pellet ingresa al organismo.
- Finalmente el producto obtenido se distribuye en 10 partes iguales, cada una de las cuales mediante compactación en un instrumento adaptado para éste sistema, produce un pellet de 3 mm de diámetro y 4 mm de altura con una concentración de 200 µg de la hormona.

2.3. SUMINISTRO DE HORMONAS *IN VIVO*

La aplicación de las hormonas se la realizó directamente sobre los animales, haciendo uso de inyecciones e implantes intramusculares.

2.3.1. Anestesiado de los peces

Para mantener a los peces tranquilos durante su manipulación y evitar la pérdida de escamas y daños en la superficie de la piel, se añadió al agua del tanque el compuesto anestésico benzocaína (SIGMA E 1501) en dosis de 40 ppm.

Con esta dosis, se observaron los efectos de la anestesia 5-10 min luego de aplicarla al tanque y el tiempo de recuperación de los peces una vez que se colocó a los animales en agua sin anestésico era de 1 min aproximadamente.

2.3.2 Obtención de gametos

La obtención de gametos era realizada en los tanques de cultivo una vez que los animales se encontraban anestesiados.

2.3.2.1. Hembras

Para obtener las muestras de oocitos se utilizó una cánula plástica de 2 mm de diámetro exterior y 1 mm de diámetro interior que se introdujo en el oviducto situado en la papila genital y así eran obtenidos mediante absorción.

La muestra de oocitos obtenida se colocó en solución Serra, con la finalidad de aclarar el citoplasma de los oocitos y poder observar a simple vista la posición de su núcleo y en base a esto determinar el grado de madurez de la hembra; posteriormente el diámetro de los oocitos se midió en un proyector de perfiles (Mitutoyo) a fin de establecer el rango dentro del cual se encuentran los oocitos maduros.

Los oocitos fueron fijados en NBF (Neutral Buffered Formalin) previo a la realización de cortes histológicos. Las muestras se sometieron a tinción hematoxilina-eosina (H-E) y periodic acid schiff (PAS) antes de observar al microscopio sus características morfológicas.

2.3.2.2. Machos

Las muestras de esperma fueron obtenidas al realizar un masaje abdominal del pez, desde la zona cercana a las aletas ventrales hasta la región adyacente a la papila genital. Previa a la obtención del esperma se secó la zona que rodea a la papila genital, para evitar que la muestra entre en contacto con el agua de mar y de esta forma evitar que los

espermatozoides sean activados antes de ser observados al microscopio y posteriormente determinar su motilidad.

2.3.3. Aplicación de hormonas

Realizada la canulación de las hembras y la presión abdominal de los machos, en base a los resultados obtenidos se procedía a la utilización de la HCG o la LHRHa.

2.3.3.1. HCG (Gonadotropina Coriónica Humana)

Esta hormona fue suministrada mediante inyecciones intraperitoneales en la base de la aleta pectoral del pez. Con éste método se evita la pérdida de hormona, provocada por la reacción muscular involuntaria del pez cuando se la administra intramuscularmente en la región dorsal, haciéndose necesario realizar masajes en la zona que rodea al sitio donde se aplica la inyección. La absorción de la hormona en el sistema sanguíneo es más rápida por el mesotelio que recubre la cavidad peritoneal por lo que se facilita el efecto de la hormona.

Las dosis utilizadas en el bioensayo fueron de 1000 U.I. HCG.kg⁻¹ de reproductor hembra y 500 U.I. HCG.Kg⁻¹ de reproductor macho.

2.3.3.2. LHRHa (Luteinizing Hormone Releasing Hormone Ethylamide)

Los pellets que contenían la hormona LHRHa en una dosis de aproximadamente 100 µg LHRHa.Kg⁻¹ de reproductor macho o hembra, fueron implantados intramuscularmente en la región dorsal del pez, haciendo uso de una jeringa de implantación. Para evitar infecciones se aplicó solución de yodo sobre la herida formada.

2.4. SEGUIMIENTO DEL DESARROLLO GONADAL

Luego de 48 horas de aplicada la hormona HCG ó 2-3 semanas en el caso de la LHRHa, se procedía nuevamente a tomar muestras de oocitos y esperma de los reproductores inducidos, siguiendo el método descrito anteriormente, para evaluar el desarrollo de los oocitos y el incremento en el flujo de esperma.

2.5. INCUBACION DE HUEVOS

Los huevos desovados fueron fertilizados naturalmente por los machos presentes en el mismo tanque.

La recolección de los huevos se realizó diariamente de los tanques de reproductores mediante una tubería que recogía el agua de la superficie y la enviaba a una bolsa de malla en donde eran almacenados los huevos.

Durante la mañana los huevos desovados eran transferidos a un tanque cónico de 50 l de capacidad (Fig. 17) en donde se los tenía con aireación para mantener una distribución homogénea de los mismos en el cuerpo de agua. Luego se procedió a determinar la cantidad total de huevos a través de cuatro alícuotas de 10 ml que eran tomadas por medio de una pipeta y colocadas en una caja Petri, a la cual se adicionó 0,5 ml de lugol con la finalidad de teñir los huevos y facilitar su conteo. Una vez realizado el conteo se retiró la aireación y se dejó reposar el agua por 10 min para que decanten los huevos no fertilizados, los cuales eran retirados a través de una tubería que recoge el agua del fondo. A continuación se introducía en el tanque nueva agua para reponer la pérdida al retirar los huevos, se colocó nuevamente aireación y se procedió al conteo de los huevos viables que permanecían flotando en la superficie del agua, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

De este tanque se tomó una muestra de huevos para establecer el porcentaje de fertilización al observar al microscopio el estadio de desarrollo embrionario en que se encontraban los mismos. Además se determinaba el diámetro promedio de los huevos al

medirlos en el proyector de perfiles (Mitutoyo).

Posteriormente los huevos eran transferidos a un tanque cónico de 200 l de capacidad (Fig. 17). El recambio de agua realizado a través de una malla de 400 μm fue de 200 a 300% y la aireación suministrada era suave para mantener a los huevos en movimiento y evitar su aglomeración en la superficie del agua provocando el aplastamiento y asfixia de los mismos.

A las 24 horas se determinaba el porcentaje de eclosión de los huevos fertilizados al establecer la cantidad de larvas presentes en el cuerpo de agua, siguiendo el mismo procedimiento que para el conteo de huevos.

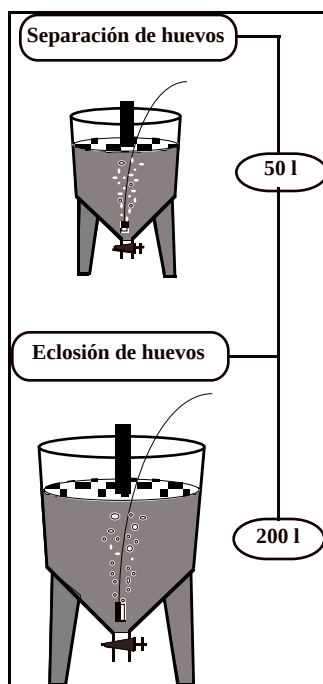


Fig. 17. Tanques utilizados para separación y eclosión de huevos de robalos.

3. **RESULTADOS**

3.1 INDUCCION HORMONAL DE LA MADURACION, DESOVE Y ESPERMIACION DE LOS ROBALOS DEL GRUPO No 1

3.1.1. **Primera inducción**

La primera inducción se inició el 4 de febrero de 1997; se trabajó con 4 reproductores hembras cuyo peso oscilaba entre 10 y 12,3 Kg y 2 reproductores machos con pesos de 2,1 (No. 8) y 2,8 (No. 7) Kg (Tabla 2).

Al realizar la canulación de todas las hembras se obtuvo fluido celómico. Se observó la presencia de oocitos en las muestras tomadas de las hembras No. 1, 5 y 10. La hembra No. 5 presentó oocitos con diámetro entre 300 y 400 μm ; mientras que en las otras hembras los oocitos se encontraron separados en dos grupos, uno mayoritario, presente en ambos animales, que abarcaba los oocitos con diámetro entre 40 y 70 μm y otro formado por oocitos con diámetros entre 200 y 300 μm (Hembra 10) o entre 100 y 200 μm (Hembra No.1).

Los machos por su parte no mostraron espermiación al realizarles presión abdominal.

Para la primera prueba la hormona utilizada fué la LHRHa, suministrada mediante pellets que contenían 200 μg de LHRHa cada uno, a reproductores machos y hembras. La dosis hormonal empleada estuvo en el rango de 95,2 a 142,9 $\mu\text{g LHRHa.Kg}^{-1}$ de peso total de reproductor (Tabla 2).

Tabla 2. Primer implante de pellets con LHRHa a reproductores del primer grupo, 04/02/97

Reproductor	P.T. (Kg)	No. Pellets	$\mu\text{g LHRHa.Kg}^{-1}$ de P.T.
1 (F)	10	5	100
4 (F)	12,1	6	99,2
5 (F)	12,3	6	97,6
10 (F)	11,3	6	106,2
7 (M)	2,8	2	142,9
8 (M)	2,1	1	95,2

P.T. = Peso Total

F = Femenino

M = Masculino

Tres semanas posteriores al implante hormonal se realizó el seguimiento del desarrollo gonadal de los reproductores, notándose un incremento en el peso de los animales, con excepción de las hembras No. 4 y 10 (Tabla 3).

Posteriormente se tomaron nuevamente muestras de oocitos y espermatozoides de los reproductores tratados. Los oocitos fueron medidos y separados en grupos de acuerdo a su diámetro, cada grupo tenía una amplitud de 100 μm . Todas las hembras presentaron oocitos con diámetros menores a 600 μm , encontrándose principalmente oocitos con diámetros menores a 200 μm .

La hembra No. 1 presentó oocitos con diámetros menores a 600 μm . Se encontraron con mayor frecuencia oocitos con diámetros entre 1-99 μm (52,1%), seguido de los oocitos con diámetros entre 100-199 μm (38,3%); el resto de los grupos presentó una baja frecuencia (0,4 a 5,4%) comparados con los dos primeros grupos (Fig. 18).

En la hembra No. 4, se observó oocitos con diámetros menores a 500 μm . El mayor porcentaje de oocitos estuvo en el rango de 100-199 μm de diámetro (52,6%), seguido del grupo conformado por oocitos con diámetros entre 1-99 μm (43,3%), los grupos restantes al igual que la hembra anterior mostraron baja frecuencia, siendo esta entre 0,5 y 2,6 % (Fig. 19).

La hembra No. 5 mostró oocitos con diámetros menores a 600 μm . Los oocitos con diámetros entre 1 y 99 μm fueron encontrados con mayor frecuencia (43,7%), seguido por

el grupo conformado por oocitos con diámetros entre 100-199 μm (33,1%); otro grupo que presentó una elevada frecuencia (12,7%) comparado con los grupos restantes cuya frecuencia estuvo entre 1,8 y 5,1%, fue el formado por oocitos con diámetros de 400 a 499 μm (Fig. 20).

En la hembra No. 10 se encontraron oocitos con diámetros menores a 500 μm . Los grupos que mayor frecuencia presentaron fueron los constituídos por oocitos con diámetros entre 1-99 μm (52,2%) y 100-199 μm (42,4%); los otros grupos tuvieron un porcentaje menor al 3%. En este animal no se observó oocitos con diámetros entre 300-399 μm (Fig. 21).

Se observaron cortes histológicos con tinción H-E de los oocitos tomados por canulación, estos se encontraron en estado perinucleolar (Fig. 22) ó en fase vitelogénica (Fig. 23) con presencia de vesículas de vitelo, gránulos de vitelo y pequeñas gotas lipídicas .

Ambos machos presentaron espermiación, el tiempo máximo de motilidad de los espermatozoides al contacto con agua de mar a 35 ups fué aproximadamente 5 min.

Al obtener oocitos con diámetros mayores a 400 μm que presentaban vitelogénesis, se inyectó a las hembras una única dosis de HCG de 1000 U.I. HCG.Kg^{-1} de peso total de reproductor. Los machos, por presentar espermiación no fueron tratados con ésta hormona (Tabla 3).

Tabla 3. Inducción del desove de hembras del primer grupo con HCG, 26/02/97

Reproductor	P.T. (Kg)	Dosis (U.I. HCG.Kg^{-1} de P.T.)
1(F)	10,3	1.000
4(F)	11,9	1.000
5(F)	12,6	1.000
10(F)	11,2	1.000

P.T. = Peso Total

F = Femenino

Luego de 24 horas de aplicada la hormona se tomaron muestras de oocitos de las hembras, y al medir su diámetro se observó lo siguiente:

La hembra No. 1 presentó oocitos con diámetros menores a 700 μm . Comparado con la medición realizada antes de inducir a la hembra con HCG se notó una disminución en la frecuencia de oocitos entre 1-99 μm (25,5%) con incremento en la frecuencia de oocitos entre 100-199 μm (46,4%). Además se observó la aparición de un elevado porcentaje de oocitos con diámetros entre 600 y 699 μm (11,7%) mientras que el resto de grupos también presentó un aumento de 2 a 4 veces el valor de su frecuencia, con excepción del conformado por oocitos con diámetro de 400-499 μm que disminuyó de 5,4 a 2,6 % (Fig. 18).

La hembra No. 4 al igual que la hembra anterior presentó oocitos con diámetros menores a 700 μm . Comparado con la medición realizada el día anterior, únicamente existió una disminución en la frecuencia de los oocitos entre 1-99 μm de diámetro (18,3%), encontrándose la mayor frecuencia en el grupo de oocitos entre 100-199 μm de diámetro (66,4%). Un nuevo grupo que sobresalió fué el conformado por oocitos de 600 a 699 μm que presentó una frecuencia de 6%, los otros grupos tuvieron frecuencias entre 1,4 y 2,8% (Fig. 19).

En la muestra tomada de la hembra No. 5 se encontraron oocitos con diámetros menores a 1 mm. Comparado con la frecuencia de los grupos de oocitos medidos previo a la inducción hormonal con HCG, se observó disminución en los grupos conformados por oocitos entre 1-99 hasta 400-499 μm y el aumento de aproximadamente dos veces la frecuencia de los oocitos entre 500-599 μm . En esta hembra la mayores frecuencias (35,3% y 29,3%) estuvieron en el grupo de oocitos de 1-99 μm y de 100-199 μm de diámetro respectivamente. Además, de manera similar a las hembras 1 y 4, el nuevo grupo de oocitos entre 600-699 μm presentó una elevada frecuencia (12,1%), comparado con el resto de grupos cuya frecuencia estuvo entre 0,5 y 7,7 % (Fig. 20).

La hembra No. 10 presentó la papila genital inflamada probablemente causada por la canulación realizada el día anterior por lo que no se tomaron muestras de oocitos de este

ejemplar.

Se observaron de cada muestra de oocitos cortes histológicos con tinción H-E mostrando oocitos en estado perinucleolar (Fig. 22), en fase vitelogénica (Fig. 23), y en fase de maduración (Fig. 24-25) con el inicio de la fusión de gotas lipídicas y la migración de la vesícula germinal.

En los machos aún se obtenía espermiación al realizar la presión abdominal.

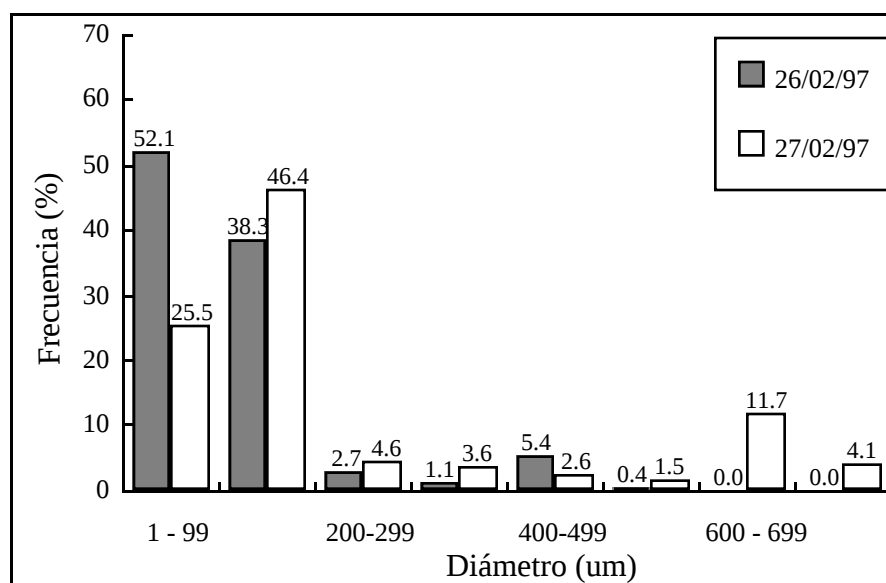


Fig. 18. Distribución de los oocitos de la hembra No. 1 antes y después de la inducción hormonal con HCG.

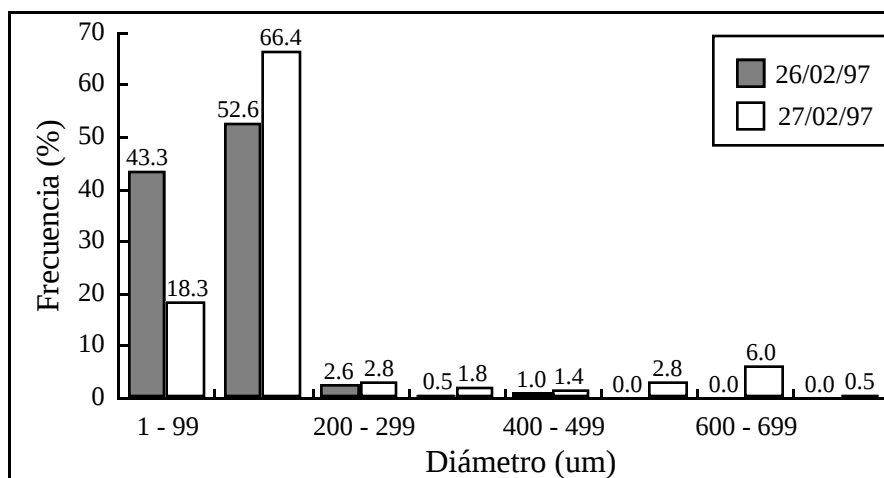


Fig. 19. Distribución de los oocitos de la hembra No. 4 antes y después de la inducción hormonal con HCG.

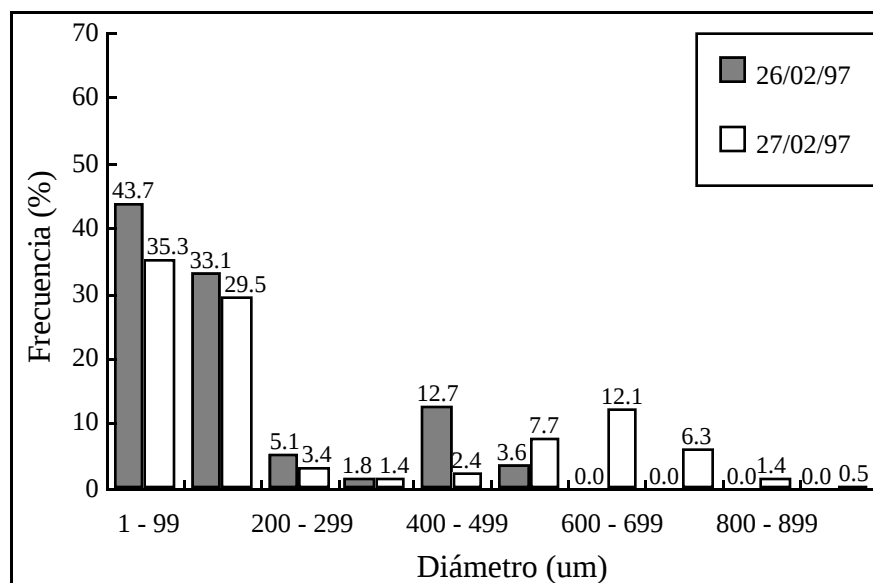


Fig. 20. Distribución de los oocitos de la hembra No. 5 antes y después de la inducción hormonal con HCG.

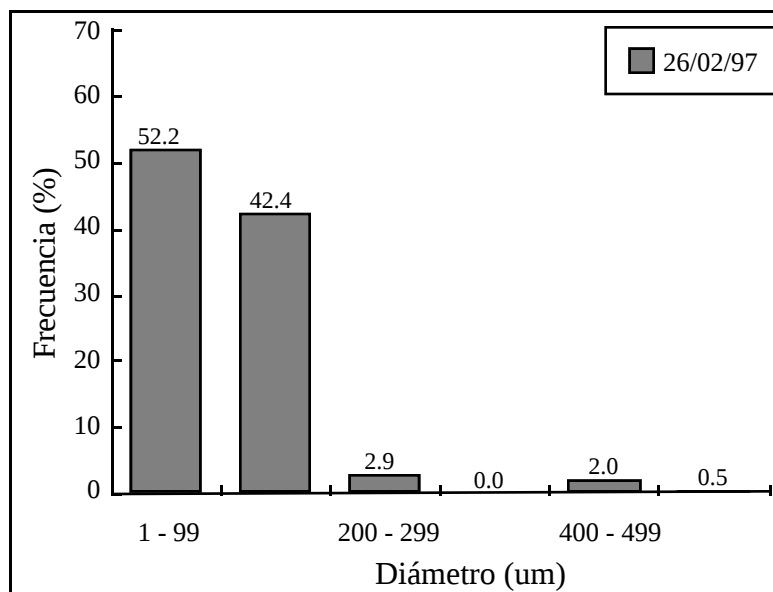


Fig. 21. Distribución de los oocitos de la hembra No. 10 antes de la inducción hormonal con HCG.



Fig. 22. Oocitos de robalo en fase perinucleolar.

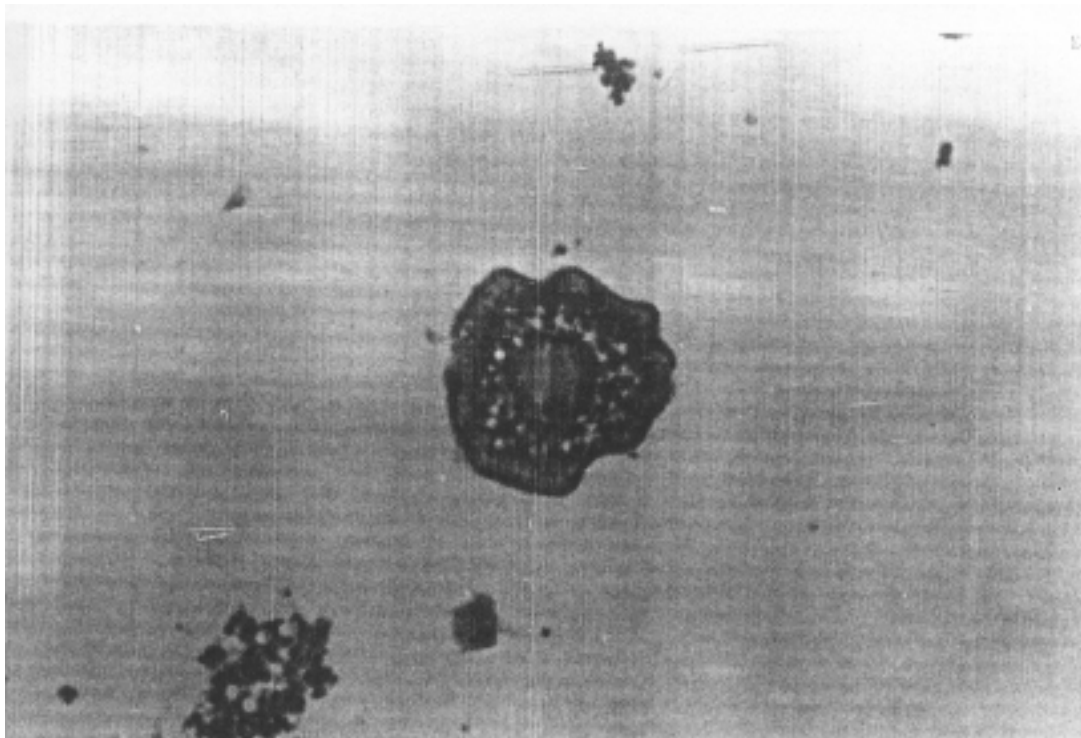


Fig. 23. Oocitos de robalo en fase vitelogénica.

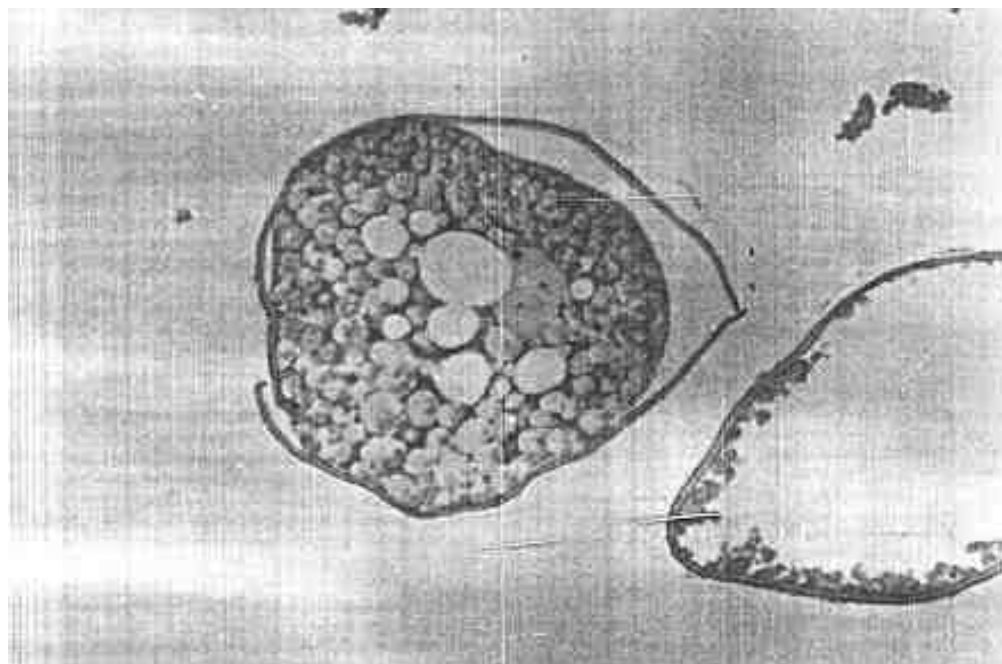


Fig. 24. Oocitos de robalo en fase de maduración.

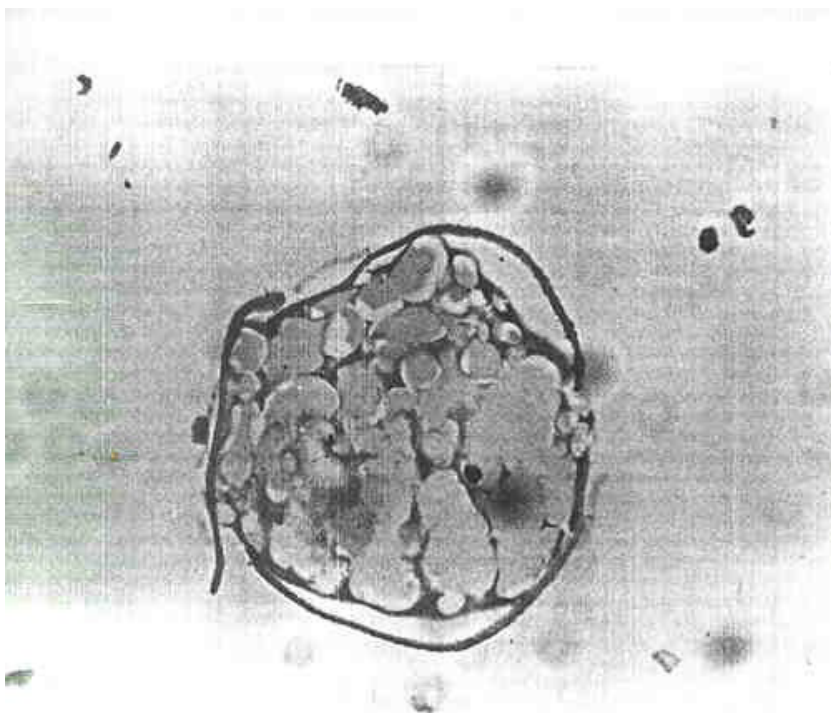


Fig. 25. Oocito de robalo previo a ovulación.

Luego de 36-40 horas de aplicada la hormona HCG se iniciaron los desoves de las hembras, siendo difícil establecer cuántas hembras desovaron debido a que en el tanque se encontraban las cuatro hembras.

Los desoves se realizaron durante la noche por un período de 7 días consecutivos. La cantidad total de huevos desovados fué elevada el primer y segundo día obteniéndose 4.875.000 y 1.108.000 huevos respectivamente. Posteriormente disminuyó drásticamente la cantidad de huevos desovados, encontrándose un máximo de 307.000 huevos al tercer día y presentando la tendencia a disminuir hasta llegar a un mínimo de 500 huevos el último día (Tabla 4).

Al colocar los huevos en agua de mar a 35 ups en el recipiente de 50 l utilizado para el conteo de los mismos y dejar el agua sin aireación por 10 min aproximadamente, se observó la formación de una capa superficial de huevos.

La cantidad total de huevos flotantes que conformaban esta película superficial representó del 2,58 al 24,63 % de los huevos desovados (Tabla 4).

Los huevos fertilizados se encontraron al momento de ser observados al microscopio en la etapa de blástula (Fig. 26) en base al conteo de la cantidad de huevos fertilizados se determinó la razón de fertilización durante el período de desove, misma que estuvo entre 0,58 y 2,81 % (Tabla 4).

El diámetro promedio de los huevos desovados varió a lo largo del período de desove, observándose un mínimo de $720,7 \pm 28,9 \mu\text{m}$ en el primer desove, teniendo un incremento hasta llegar a un máximo de $764,9 \pm 15,5 \mu\text{m}$ al tercer día de desove y posteriormente una disminución hasta alcanzar $749,1 \pm 29,9 \mu\text{m}$ en el desove final (Tabla 4).

A las 24 horas posteriores al desove, se observaron nuevamente los huevos, mismos que se encontraban aún en la etapa de blástula, es decir, que no se había llevado a cabo el desarrollo embrionario, fenómeno que se observó durante todo el período de desove (Fig. 24).

Tabla 4. Desoves de Robalos inducidos con LHRHa+HCG

Fecha	Huevos Totales (x 1000)	Huevos Flotantes (x 1000)	Huevos Fertilizados (X 1000)	Razón de Fertilización (%)	Diámetro promedio de huevos (μm)
28/02/97	4.875	300	28,3	0,6	$720,7 \pm 22,9$
01/03/97	1.108	273	13,6	1,2	$745,6 \pm 30,3$
02/03/97	387	10	1,	0,3	$764,9 \pm 5,5$
03/03/97	0	0	0	0	0
04/03/97	146	0	0	0	$755,2 \pm 14,8$
05/03/97	120,7	5	3,4	2,8	$754,8 \pm 23,5$
06/03/97	0,5	0	0	0	$749,1 \pm 29,9$

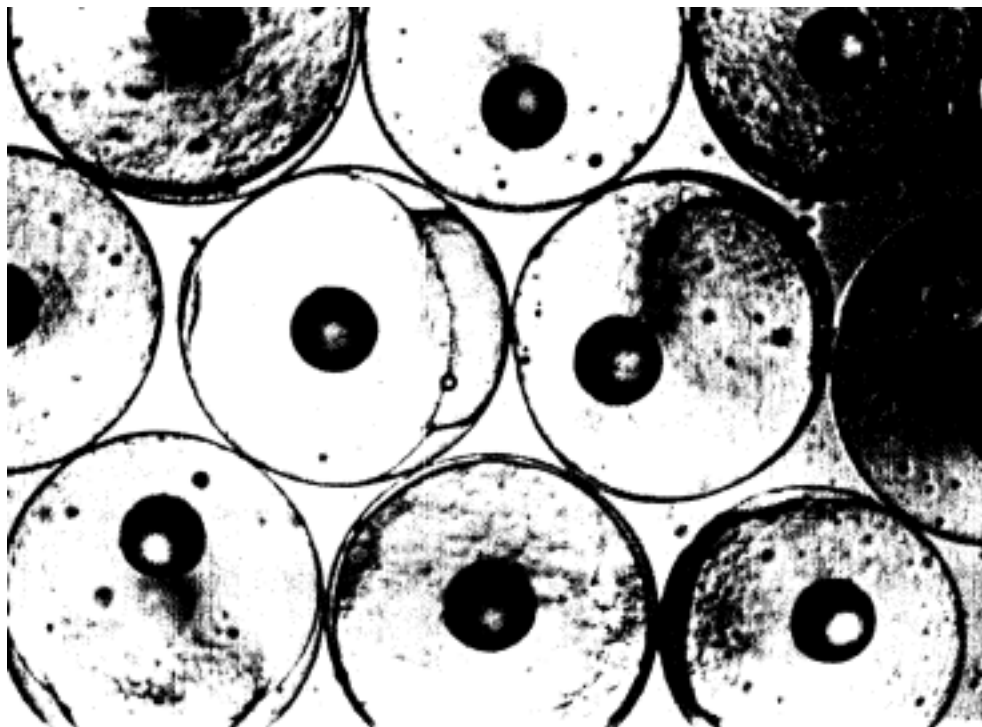


Fig. 26. Huevos fertilizados de robalo en fase de blástula.

3.1.2. Segunda inducción

Dos meses después de concluídos los desoves, se inició la segunda inducción de los reproductores de éste grupo. Las hembras presentaron un peso inicial entre 10,2 y 12 Kg y los machos 2,5 y 3,3 Kg (Tabla 5).

Tanto en hembras como en machos no se logró obtener muestras de oocitos y esperma respectivamente.

Se implantó nuevamente a todos los reproductores pellets con LHRHa; la dosis suministrada varió entre 80 y 121,2 μg de LHRHa.Kg⁻¹ de peso total de reproductor (Tabla 5).

Tabla 5. Segundo implante de pellets con LHRHa a reproductores del primer grupo, 07/05/97

Reproductor	P.T. (Kg)	No. Pellets	$\mu\text{g LHRHa.Kg}^{-1}$ de P.T.
1(F)	10,2	5	98
4(F)	12	6	100
5(F)	10,9	5	91,7
10(F)	11,7	6	102,6
7(M)	3,3	2	121,2
8(M)	2,5	1	80

P.T. = Peso Total

F = Femenino

M = Masculino

Luego de dos semanas de aplicada la hormona se intentó obtener muestras de productos gonadales de los reproductores, teniendo resultados no satisfactorios.

Se implantó por segunda vez pellets con LHRHa a todos los reproductores del grupo, en éste caso la dosis suministrada vario entre 91,7 y 137,9 μg de LHRHa.Kg⁻¹ de peso total de reproductor (Tabla 6).

Tabla 6. Tercer implante de pellets con LHRHa a reproductores del primer grupo, 22/05/97

Reproductor	P.T. (Kg)	No. Pellets	$\mu\text{g LHRHa.Kg}^{-1}$ de P.T.
1(F)	10,3	5	97,1
4(F)	12,1	6	99,2
5(F)	10,9	5	91,7
10(F)	11,7	6	102,6
7(M)	3,4	2	117,6
8(M)	2,9	2	137,9

P.T. = Peso Total

F = Femenino

M = Masculino

A las dos semanas de implantados por segunda vez los pellets, se realizó el seguimiento del desarrollo gonadal; tanto en hembras como en machos no se logró obtener oocitos ó esperma.

3.1.3. Tercera inducción

Al finalizar la segunda inducción, se inició la última prueba con éste grupo de reproductores.

Todos los animales presentaron una disminución en su peso comparado con el muestreo realizado dos semanas antes (Tabla 7), no se logró obtener oocitos o esperma.

La hormona utilizada fue la HCG, en una única dosis de 1000 U.I. HCG.Kg⁻¹ de peso total de reproductor hembra y 500 U.I.HCG.Kg⁻¹ de peso total de reproductor macho (Tabla 7).

Tabla 7. Inducción del desarrollo gonadal de reproductores del primer grupo con HCG, 09/06/97

Reproductor	P.T. (Kg)	Dosis (U.I. HCG.Kg ⁻¹ de P.T.)
1(F)	10,1	1000
4(F)	11,9	1000
5(F)	10,8	1000
10(F)	11,7	1000
7(M)	3,3	500
8(M)	2,7	500

P.T. = Peso Total

F = Femenino

M = Masculino

Luego de 24 horas de suministrada la hormona se realizó el seguimiento del desarrollo gonadal de los reproductores, obteniendo espermiación en machos.

3.2. INDUCCION HORMONAL DE LA MADURACION, DESOVE Y ESPERMIACION DE LOS ROBALOS DEL GRUPO No 2

3.2.1 Primera inducción

Con el segundo grupo de reproductores, 4 hembras y 3 machos, la etapa de inducción al desove y espermiación inició el 20 de marzo de 1997.

Las hembras utilizadas con un peso inicial entre 7,70 y 12,1 Kg, mientras que los machos pesaron 3,1, 5,3 y 13,1 Kg (Tabla 8).

Sólo dos hembras (No. 2 y 9) presentaron oocitos con diámetro promedio de 68,2±22,3 µm y 74,7±12,1 µm respectivamente y un macho (No. 6) presentó espermiación (Tabla 8).

Al observar el corte histológico de los oocitos obtenidos por canulación, estos se encontraban en fase perinucleolar (Fig. 22).

La hormona LHRHa se suministró a todas las hembras y a los machos con excepción de aquel que presentó espermiación (No. 6). La dosis empleada entre 91,6 y 129 μg de LHRHa.Kg⁻¹ de peso total de reproductor (Tabla 8).

Tabla 8 . Primer implante de pellets con LHRHa a reproductores del segundo grupo, 20/03/97

Reproductor	P.T. (Kg)	No. Pellets	μg LHRHa.Kg ⁻¹ de P.T.
2(F)	9,5	5	105,3
9(F)	11,3	6	106,2
11(F)	12,1	6	99,2
12(F)	7,7	4	103,9
3(M)	13,1	6	91,6
13(M)	3,1	2	129

P.T. = Peso Total

F = Femenino

M = Masculino

Dos semanas después de administrada la hormona se tomó nuevamente muestras de oocitos y esperma.

Las hembras No. 2, 9 y 12 presentaron oocitos con diámetros de $90,8 \pm 16,9 \mu\text{m}$, $77,9 \pm 14,7 \mu\text{m}$ y $63,3 \pm 19,2 \mu\text{m}$ respectivamente.

Los machos, uno de los ejemplares tratados hormonalmente mostró espermiación (No. 13) y al que no le fue implantada la LHRHa todavía presentaba espermiación (No. 6).

Se implantó por segunda vez la hormona LHRHa a las 4 hembras y al macho que no mostró espermiación, la dosis utilizada estuvo entre 92,6 y 111,1 μg de LHRHa.Kg⁻¹ de peso total de reproductor (Tabla 9).

Tabla 9 . Segundo implante de pellets con LHRHa a reproductores del segundo grupo, 01/04/97

Reproductor	P.T. (Kg)	No. Pellets	$\mu\text{g LHRHa.Kg}^{-1}$ de P.T.
2(F)	9	5	111,1
9(F)	10,8	5	92,6
11(F)	11,7	6	102,6
12(F)	7,3	4	109,6
3(M)	12,5	6	96

P.T. = Peso Total

F = Femenino

M = Masculino

A las 3 semanas de implantada la hormona se realizó el seguimiento del desarrollo gonadal de hembras y machos.

Se obtuvo muestras de oocitos de 3 hembras (No. 2, 9 y 12). El diámetro promedio de los oocitos de la hembra 2 se mantuvo similar al de los oocitos medidos previo al implante hormonal, siendo éste de $89.90 \pm 20.18 \mu\text{m}$. En las hembras No. 9 y 12 se encontraron oocitos con diámetro promedio de $96,5 \pm 15,2 \mu\text{m}$ y $81,0 \pm 10,4 \mu\text{m}$ respectivamente. Al igual que los oocitos del muestreo anterior, todos se encontraban en fase perinucleolar.

Ninguno de los machos presentó espermiación al momento de realizarles la presión abdominal.

3.2.2. Segunda inducción

El segundo intento de inducción hormonal del desove y espermiación de los reproductores se inició el 8 de Mayo de 1997.

Las hembras mostraron al momento de la inducción hormonal un peso inicial entre 6,9 y 11,1 Kg y los machos peso de 2,9, 5,5 y 12,9 Kg (Tabla 10).

Pprevio a la aplicación de la hormona se tomó muestras de oocitos, obteniéndose muestras en las hembras No. 2 y 11. El diámetro promedio de los oocitos fue $94,9 \pm 15,7 \mu\text{m}$ para la hembra 2 y $78,3 \pm 11,5 \mu\text{m}$ para el otro ejemplar.

De los tres machos con que se trabajó, ninguno de ellos mostró espermiación al realizarles la presión abdominal.

Se implantaron pellets con LHRHa a todos los reproductores; la dosis aplicada varió entre 69 y 114,9 μg de LHRHa.Kg⁻¹ de peso total de reproductor (Tabla 10).

Tabla 10. Tercer implante de pellets con LHRHa a reproductores del segundo grupo, 08/05/97

Reproductor	P.T. (Kg)	No. Pellets	μg . LHRHa.Kg ⁻¹ de P.T.
2(F)	8,7	5	114,9
9(F)	11	6	109,1
11(F)	11,1	6	108,1
12(F)	6,9	3	86,9
3(M)	12,9	6	93
6(M)	5,5	3	109,1
13(M)	2,9	1	69

P.T. = Peso Total

F = Femenino

M = Masculino

El seguimiento del desarrollo gonadal se realizó a las 3 semanas de suministrada la hormona. No se logró obtener muestras de oocitos en ninguna de las hembras y de los machos el No. 6 presentó espermiación por lo que no fue tratado hormonalmente.

Se suministró una segunda dosis de LHRHa, misma que estuvo entre 74,1 y 119,4 μg LHRHa.Kg⁻¹ de peso total de reproductor (Tabla 11).

Tabla 11. Cuarto implante de pellets con LHRHa a reproductores del segundo grupo, 23/05/97

Reproductor	P.T. (Kg)	No. Pellets	μg LHRHa.Kg ⁻¹ de P.T.
2(F)	9,5	5	105,3
9(F)	11,4	6	105,3
11(F)	11,9	6	100,8
12(F)	6,7	4	119,4
3(M)	12,8	6	93,7
13(M)	2,7	1	74,1

P.T. = Peso Total

F = Femenino

M = Masculino

Luego de dos semanas de administrada la hormona, se realizó canulación a las hembras y presión abdominal a los machos sin obtener muestras de oocitos o espermia.

3.2.3. Tercera inducción

La tercera inducción al desove y espermiación del segundo grupo de reproductores se realizó el 10 de junio de 1997. En este ensayo se utilizó la hormona HCG, suministrada mediante una sola dosis de 1.000 U.I. HCG.Kg⁻¹ de peso en las hembras ó 500 U.I. HCG.Kg⁻¹ de peso en los machos (Tabla 12).

Tabla 12. Inducción del desarrollo gonadal de reproductores del segundo grupo con HCG, 10/06/97

Reproductor	P.T. (Kg)	Dosis (U.I. HCG.Kg ⁻¹ de P.T.)
2(F)	9,3	1000
9(F)	11,4	1000
11(F)	12,3	1000
12(F)	6,4	1000
3(M)	12,5	500
6(M)	6,1	500
13(M)	2,5	500

P.T. = Peso Total

F = Femenino

M = Masculino

Luego de 48 horas de realizada la inducción se efectuó el respectivo seguimiento del desarrollo gonadal en hembras y machos. Los machos presentaron espermiación al realizarles presión abdominal, mientras que con el método de canulación no se logró obtener muestras de oocitos de las hembras.

3.3. EVALUACION DEL DESARROLLO GONADAL DE LAS HEMBRAS DE ROBALO.

Una vez finalizados los ensayos de inducción a la maduración y desove de las hembras de robalo de ambos grupos, mediante la administración de las hormonas LHRHa y HCG, y al no tener resultados satisfactorios, se decidió sacrificar una hembra de cada grupo (No. 4 y 11) con la finalidad de determinar la posible causa para que no se desarrolle la maduración y desove en estos animales.

La hembra No. 4 al momento de ser sacrificada reportó 11,5 Kg de peso total y 58,6 g de

peso de gónada. El índice gonadosomático determinado a partir de la siguiente fórmula:

Índice gonadosomático = $\frac{\text{Peso de gonada} * 100}{\text{Peso total} * 1000}$ fue 0.51.

Peso total * 1000

Los ovarios presentaron una coloración naranja, se observó en el lumen un líquido transparente de apariencia viscosa que visto al microscopio no presentó oocitos embebidos en dicho líquido. Se tomaron muestras de oocitos presentes entre el lumen y la pared del ovario, el diámetro promedio de estos oocitos fue de $89,8 \pm 64,5 \mu\text{m}$.

El hígado presentó coloración marrón clara. Se observó hemorragias y manchas de coloración verde oscura dispersos en el órgano. Además hubo presencia de enfisema siendo ésta la posible causa de que el hígado tuviera una consistencia muy suave.

El segundo reproductor (No. 11) tuvo un peso total de 11,5 kg y el peso de las gónadas fue 74,5 g. El índice gonadosomático fue 0.65.

El ovario mostró coloración rojiza. Al realizar corte longitudinal se observó la presencia de hemorragias en la parte interna del ovario, así como coágulos de sangre y corpúsculos amarillos en el lumen del ovario.

El hígado presentó coloración similar al anteriormente descrito. Además se observó manchas amarillas, blancas y negras, hemorragias dispersas en todo el hígado.

Se tomó muestras de tejido ovárico y hepático para la realización de cortes histológicos a los cuales se les realizó tinción H-E, para observar y diferenciar las estructuras que conforman el oocito, y PAS, que permite determinar la presencia de lipoproteínas al ser estos compuestos teñidos de color rojo intenso.

Las muestras de ovarios de ambos reproductores teñidas con H-E mostraron un incremento en el grosor de la pared ovárica, provocada por el aumento del tejido conectivo presente en la pared. Los oocitos en estadio temprano de la fase perinucleolar (Fig. 27),

comprobandose la ausencia de vitelo en el citoplasma de los oocitos, de acuerdo a la tinción PAS.

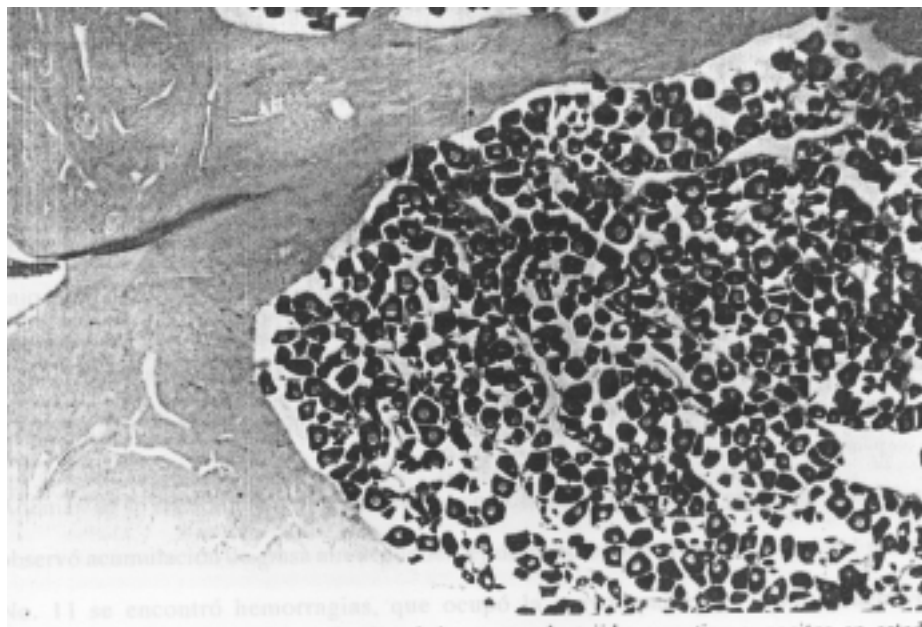


Fig. 27 Corte histológico de ovario de robalo mostrando tejido conectivo y oocitos en estado perinucleolar. Tinción H-E.

Los corpúsculos que se encontró en el lumen del ovario del segundo ejemplar (No. 11) presentaron múltiples quistes de tamaño variable que contenían líquido amarillo y que cubrían la mayor parte del corpúsculo, y grupos de oocitos en estadio perinucleolar ubicados en ambos polos.

Al observar los cortes histológicos del hígado de ambos animales, se encontró lo siguiente:

1) La mayoría de los hepatocitos mostraron un incremento en la concentración de lípidos presentes en el citoplasma, por cuanto al ser teñidos con H-E se observó en ellos el citoplasma totalmente incoloro. Algunas células presentaron hipervacuolización de su citoplasma que provocó el aplastamiento del núcleo contra la membrana plasmática. El contenido de las vacuolas era de tipo lipídico, demostrado con la tinción PAS. Al aplicar esta tinción se observó que algunos hepatocitos presentaban en su citoplasma compuestos

lipoprotéicos por cuanto presentaron una coloración rojiza, no se pudo determinar si estas sustancias eran vitelogenina ya que la tinción PAS no permite diferenciar a los compuestos lipoprotéicos entre sí (Fig. 28).

2) Un aumento de tejido conectivo especialmente entre la cápsula y el estroma, y alrededor del tejido pancreático. El tejido conectivo corresponde a las manchas blancas observadas externamente. Este tejido era de tipo conjuntivo laxo, determinándose, por el bajo número de núcleos presentes y la disposición irregular.

3) La presencia de glóbulos rojos llenando los sinusoides, que confirman la existencia de hemorragias observadas externamente (Fig. 29).

Además de lo mencionado anteriormente, en el hígado del primer ejemplar (No.4) se observó acumulación de grasa alrededor del tejido pancreático (Fig. 29), en el del robalo No. 11 se encontró hemorragias, que ocupó la mayor parte del tejido conectivo, localizadas en los espacios intertrabeculares, además de la presencia de focos basofílicos posiblemente de regeneración ubicados en el tejido hepático.

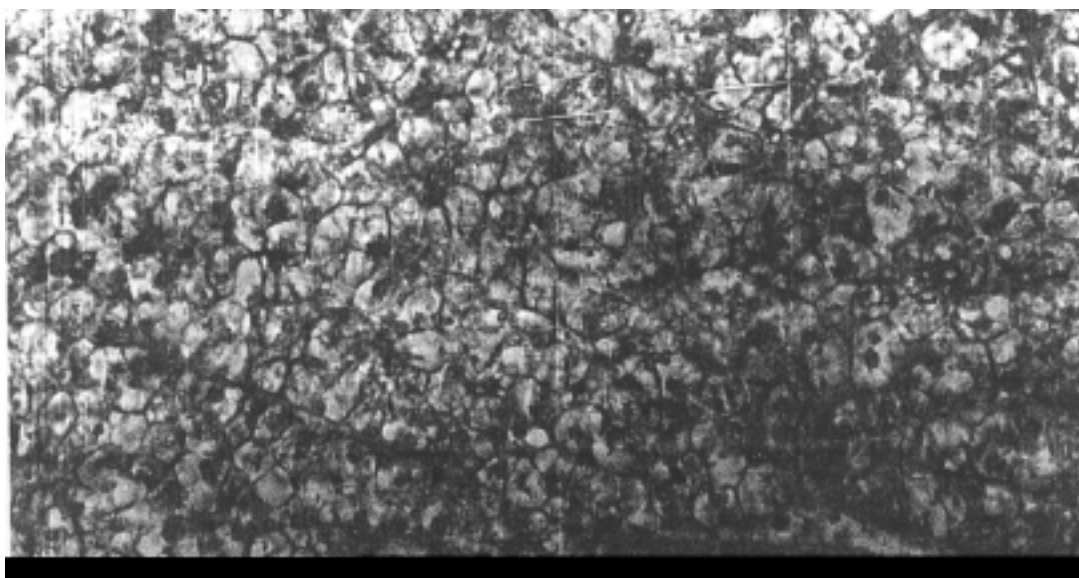


Fig. 28. Corte histológico de hígado de robalo mostrando hepatocitos con presencia de glicoproteínas. Tinción PAS.

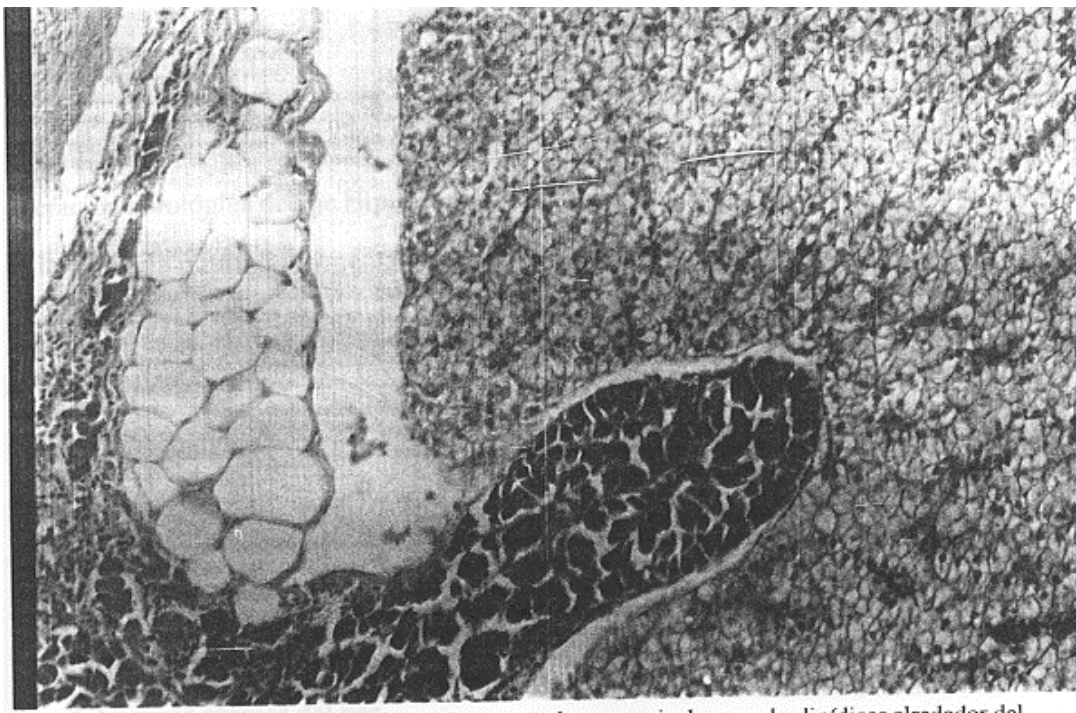


Fig. 29 Corte histológico de hígado de robalo mostrando presencia de vacuolas lipídicas alrededor del tejido pancreático y hemorragias ocupando los sinusoides del tejido hepático. Tinción H-E.

DISCUSION

La carencia de maduración y desove de peces en cautiverio es debido principalmente a una alteración fisiológica del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada. Los niveles de gonadotropina en la glándula pituitaria aumentan a medida que la época reproductiva se aproxima, pero dicha hormona generalmente no es liberada a la circulación (Zohar, 1988 *fide* Zohar *et al.*, 1989). La gonadotropina es la hormona que estimula el inicio y normal desarrollo del crecimiento y maduración del oocito, y su carencia provoca la inhibición de dicho proceso.

Este fenómeno es posible corregirlo con la administración de hormonas, que estimulen la liberación de gonadotropina por parte del reproductor, o que reemplacen a las gonadotropinas propias del pez.

Uno de los compuestos que forman parte del primer grupo mencionado anteriormente es el des-Gly¹⁰(D-Ala⁶)-LHRH etilamida. Los resultados del primer ensayo realizado con los robalos del grupo 1 indican que el LHRHa puede inducir el desarrollo oocitario en reproductores de robalo en cautiverio, posiblemente estimulando la liberación de gonadotropina.

La administración de LHRHa a través de implantes hormonales de pellets a base de colesterol, permitió la liberación gradual y constante de la hormona por un largo período de tiempo evitando la excesiva manipulación de los peces, e induciendo el desarrollo de los oocitos desde una fase temprana (Crim *et al.*, 1983 *fide* Lam, 1985). Tal fase inicial denominada estadio temprano de oocito perinucleolar, fue encontrada previo a la inducción hormonal con LHRHa realizada en el primer ensayo, y a partir de la misma se desarrollaron los oocitos hasta completar la fase vitelogénica.

El incremento en el diámetro de los oocitos que ocurrió 3 semanas posteriores a la aplicación de dicha hormona en dosis de 95,2 a 142,9 µg LHRHa.Kg⁻¹ de peso de reproductor, indicó que el desarrollo oocitario fue iniciado y acelerado por el tratamiento

hormonal. Esto es un indicativo que la LHRHa ejerció su efecto en la liberación de gonadotropina, iniciando el crecimiento oocitario. Además se encontraron oocitos perinucleolares y vitelogénicos de diámetro variable. La presencia de oocitos de diferentes diámetros es un indicativo que el *Centropomus nigrescens* se encuentra dentro del grupo de especies que presentan desarrollo ovárico de tipo asincrónico, es decir que los oocitos sufren maduración y ovulación a intervalos de 24 horas, tal como ocurre en el *Sparus aurata* (Zohar y Gordin, 1979 *fide* Zohar *et al.*, 1989)

Una vez que el oocito ha completado la fase vitelogénica, necesita ser estimulado hormonalmente para que se produzca su maduración, ovulación y desove. En este ensayo, la hormona gonadotrópica empleada para inducir la realización de dichos procesos fue la HCG.

La dosis de HCG utilizada en el presente ensayo (1.000 U.I. HCG.Kg⁻¹ de peso de reproductor), aunque menor a la utilizada por Chapman *et al.* (1982) para el *Centropomus undecimalis* (1.100 U.I. HCG.Kg⁻¹ de peso de reproductor) y Cerqueira (1991) para el *Centropomus parallelus* (1.500 U.I. HCG.Kg⁻¹ de peso de reproductor), resultó efectiva en la inducción del desove del *Centropomus nigrescens*, debido a que el oocito se encontraba lo suficientemente desarrollado como para responder positivamente al estímulo hormonal de la HCG.

Poco tiempo después de la aplicación de la hormona HCG se inició el proceso de maduración de los oocitos postvitelogénicos en las 4 hembras, siendo encontrados oocitos 24 horas posteriores a su aplicación. Se observó que en estos oocitos se había producido la migración de la vesícula germinal, así como la fusión de las gotas lipídicas, e incluso algunos de estos habían completado la maduración. Además de inducir la maduración, esta hormona estimuló el desarrollo de oocitos que se encontraban inicialmente en estadio perinucleolar ó en fase vitelogénica hasta su madurez siguiendo el mismo patrón de desarrollo descrito por Ager *et al.* (1976) para el *Centropomus undecimalis*. La hormona

HCG puede haber actuado sinérgicamente con la hormona LHRHa suministrada previamente, provocando el desarrollo de los oocitos perinucleolares presentes en el ovario al momento de inyectar a los reproductores la HCG.

Los desoves empezaron 36-40 horas después de suministrada la hormona, lo que indica que la HCG puede ser utilizada para inducir el desove de reproductores de robalo que se encuentren inicialmente con oocitos en fases anteriores al de la madurez, tales como la vitelogénesis.

A pesar de utilizar una dosis de HCG similar a la empleada por Costa (1981 *vide* Nogueira, 1991) y Chapman *et al.* (1982) para inducir a la maduración y desove del *Centropomus undecimalis*, el tiempo existente entre la administración de la hormona y el inicio del período de desove encontrado en el presente ensayo fue mayor al obtenido por Costa (1981) (24-30 h) y Chapman *et al.* (1982) (33-36 h). Esta diferencia de tiempo puede ser debida al estadio inicial que tuvieron las hembras previo a la inducción hormonal, es decir, que mientras más avanzado sea el estadio oocitario inicial de los reproductores al momento de realizar la inducción hormonal, el tiempo de latencia existente entre la inducción hormonal y el inicio del período de desove será menor.

Además del estadio inicial en que se encuentren los oocitos al momento de la aplicación de la HCG, un parámetro ambiental que influye de manera directa en el tiempo de latencia es la temperatura. Utilizando dosis similares de HCG, Chapman *et al.* (1982) al trabajar con temperaturas entre 28-30°C, obtuvo un tiempo de latencia entre 33-36 horas en el *Centropomus undecimalis*, tiempo menor al obtenido por Cerqueira (1991) en el *Centropomus parallelus* que fue de 40-45 horas temperaturas entre 23-26 °C y al del presente ensayo que fue de 36-40 horas con temperaturas entre 26-29 °C. Estas diferencias, indican que para una misma dosis utilizada el tiempo de latencia disminuye a medida que existe un aumento de temperatura, debido al incremento del metabolismo general de la especie.

Durante el período de desove, el tamaño de los huevos desovados varió, encontrándose en el primer desove un diámetro promedio de $720,7 \pm 22,9 \mu\text{m}$, mientras que en el tercer desove el diámetro promedio fué $764,9 \pm 15,5 \mu\text{m}$. En general, el tamaño de los huevos fué mayor al encontrado por Cerqueira (1991) para el *Centropomus parallelus* que fue de $650 \mu\text{m}$. Esta diferencia de tamaño puede estar relacionada con el peso de los reproductores (Bromage *et al.*, 1992 *fide* Cerda *et al.*, 1994), pues mientras Cerqueira (1991) utilizó reproductores con peso de 0,3 - 1,5 Kg, en este estudio se emplearon reproductores con peso de 10,3 - 12,3 Kg.

Se puede observar que durante el período de desove logrado con el *Centropomus nigrescens*, el tamaño de los huevos descendió gradualmente con el incremento del número de desoves a partir del tercer día. Tendencia similar ha sido encontrada en otras especies marinas tales como el red sea bream (Watanabe *et al.*, 1985 *fide* Mushiake *et al.*, 1994), red spotted grouper (Fukuhara, 1989 *fide* Mushiake *et al.*, 1994), Japanese striped knifejaw (Itoh, 1978 *fide* Mushiake *et al.*, 1994), y yellowtail (Mushiake *et al.*, 1994). Este fenómeno ocurre principalmente en reproductores alimentados con una baja ración alimenticia (Springate *et al.*, 1985 *fide* Mylonas *et al.*, 1996).

La cantidad de huevos desovados durante los 7 días que duró el período de desove fue mayor durante los dos primeros días, ocurriendo una disminución drástica en los posteriores desoves. Resultados similares han sido observados por Almendras *et al.* (1988) y Nacario (1987 *fide* Garcia, 1989), al inducir el desove del *Lates calcarifer* con la utilización de pellets y bombas osmóticas que contenían LHRHa.

De las hembras tratadas hormonalmente con HCG, el ejemplar No. 5 presentó a las 24 horas de aplicada la hormona el mayor porcentaje de oocitos entre 500 y $700 \mu\text{m}$. En base al elevado porcentaje de oocitos en fase de maduración y la considerable disminución de peso que sufrió la hembra No. 5 luego del período de desove, se puede deducir que la mayor parte de los huevos obtenidos durante el período de desove provino de dicha

hembra.

La cantidad de huevos flotantes o viables representó del 0 al 24,6% del total de huevos desovados. Bajos porcentajes de huevos viables han sido también obtenidos por Cerda *et al.* (1994) y Watanabe *et al.* (1984 *fide* Cerda *et al.*, 1994) al administrar a los reproductores dietas deficientes en proteína y minerales-vitaminas respectivamente.

La tasa de fertilización obtenida en el presente trabajo (0-2,8%) resulta baja, comparada con la obtenida por Cerqueira (1991) en *Centropomus parallelus*, que fue de 70%.

Existen muchos factores que ejercen su influencia sobre la tasa de fertilización, así tenemos que:

La baja tasa de fertilidad después de la inducción hormonal al desove, es causada probablemente por la aceleración de la maduración gonadal, lo que resulta en la disminución de la calidad de los huevos, al ser estos muy pequeños o presentar sobremadurez (Bromage *et al.*, 1992 *fide* Cerda *et al.*, 1994). Este fenómeno ha sido demostrado por Nash y Kuo (1975 *fide* García, 1989) para el "grey mullets".

Al suministrar a los reproductores una simple inyección hormonal, la vida media de la HCG en el sistema circulatorio del pez es corta. El tratamiento puede no ser adecuado para inducir la maduración y ovulación de los oocitos que todavía no sufren vitelogénesis, obteniéndose desoves de oocitos que aún no han completado su madurez, produciendo una baja calidad de los huevos que incide directamente sobre la fertilización (Doi *et al.*, 1993 *fide* Singhagraiwan y Doi, 1993).

Otro de los factores que posiblemente actúa de manera negativa en la calidad de los huevos es la edad del reproductor. De acuerdo al peso presentado por los reproductores al momento de iniciar los ensayos con ambas hormonas y tomando como base el crecimiento estimado del *Centropomus nigrescens* según Futagawa (1997), los robalos tenían una edad entre 11 y 14 años. es quizás una de las razones más importantes por la

cual la tasa de fertilización fue baja.

La relación hembra:macho existente en los tanques de desove influye de manera directa sobre la tasa de fertilización de los huevos. Matsuyama *et al.* (1995) empleando una relación 1:1 obtuvo una tasa de fertilización de 23,8-45,1%, mientras que Cerqueira (1991) al utilizar una relación 1:3 logró la fertilización del 70% de los huevos desovados.

Reproductores alimentados durante un período prolongado de tiempo con una dieta deficiente en proteínas y ácidos grasos poliinsaturados, principalmente de la familia n-3, ven afectado su desarrollo gonadal, calidad del desove y de huevos, lo que reduce la razón de fertilización (Carrillo *et al.*, 1995; Cerda *et al.*, 1994; Cerda *et al.*, 1995; Trush *et al.*, 1993 *fide* Carrillo *et al.*, 1995).

El desarrollo de los huevos fertilizados obtenidos en el ensayo se detuvo en la etapa de blástula, por lo que no existió eclosión de los huevos fecundados durante el período de desove. En el presente ensayo la densidad de huevos utilizada no influyó sobre la eclosión, ya que tanto a densidades elevadas (1500 huevos.l⁻¹) como densidades bajas (25 huevos.l⁻¹) no se produjo dicho proceso.

Dos posibles razones que afectaron el desarrollo embrionario de los huevos fecundados son, la baja calidad de los huevos desovados, así como la agitación de los mismos. Con respecto al segundo factor, Ager *et al.* (1976) encontró que la carencia de agitación durante las 6 primeras horas posteriores a la fertilización es crítica para el desarrollo del embrión del *Centropomus undecimalis*.

Posterior al desove, las hembras del primer grupo no sufrieron nuevamente maduración y desove, a pesar de ser tratadas con LHRHa y HCG.

En los intentos de inducción a la maduración con LHRHa realizados con las hembras del segundo grupo, se observó únicamente un ligero incremento en el diámetro de los oocitos perinucleolares, lo que indica que la LHRHa estimuló la liberación de gonadotropina por

parte de la hipófisis, permitiendo el incremento del diámetro de los oocitos.

Al sacrificar dos hembras se encontró que los ovarios mostraron oocitos en estado perinucleolar, lo que indica que estos oocitos no habían sufrido vitelogénesis. Esta es la razón por la cual estas hembras no desovaron a pesar de ser inducidas hormonalmente.

La vitelogénesis involucra al hígado, órgano en el cual se sintetiza la vitelogenina, precursor del vitelo de los oocitos. La no realización de este proceso en los oocitos perinucleolares encontrados en las hembras de robalo del segundo grupo, puede ser debido a la inhibición de la síntesis de vitelogenina en el hígado. En base a lo anteriormente mencionado se hizo un estudio histológico del hígado de las hembras sacrificadas.

El hígado presentó una enfermedad conocida como degeneración lipoidea o infiltración de grasa. La degeneración lipídica resulta de una gran acumulación de lípidos, generalmente grasas neutrales (Hibiya, 1982), y se caracteriza por la presencia de grandes vacuolas con contenido lipídico, que ocupan casi todo el citoplasma de los hepatocitos y provoca el aplastamiento del núcleo contra la membrana plasmática (Roberts y Bullock, 1989), como se observó en los cortes histológicos de ambos hígados.

La infiltración de grasa ocurre en peces alimentados con trazas de pescado o dietas pelletizadas, en los cuales el componente lipídico se encuentra en exceso (Roberts y Bullock, 1989).

El aumento de tejido conectivo presente en el hígado, indica que este órgano ha sufrido un proceso de inflamación, lo cual queda confirmado con la existencia de hemorragias dispersas en todo el órgano. La presencia de focos de regeneración basofílico indican que el hígado actualmente se encontraba en proceso regenerativo.

En general, la baja tasa de flotabilidad y de fertilización obtenida en el primer ensayo, la posterior carencia de maduración y desoves, así como la degeneración lipídica encontrada

en el hígado de las hembras sacrificadas, son indicativos de que la dieta suministrada a los reproductores utilizados en el presente estudio no fue la más apropiada.

En 1 de 3 intentos de inducción a la espermiación con LHRHa realizados con los reproductores machos utilizados en el presente estudio, se obtuvo resultados positivos, que aunque preliminares, abren la posibilidad de utilizar esta hormona para estimular la espermiación de reproductores de *Centropomus nigrescens*.

Por otra parte, al utilizar la hormona HCG, el 100% de los machos respondió positivamente mostrando espermiación. La efectividad mostrada en este estudio al suministrar 500 U.I. HCG.Kg⁻¹ de reproductor, indica que esta dosis hormonal puede ser utilizada para inducir la espermiación del *Centropomus nigrescens*. La HCG es una hormona análoga a la gonadotropina propia del pez, por lo que ejerce su función directamente sobre las células de Leydig estimulando la producción de esteroides involucrados en la maduración y espermiación. Dicha hormona puede actuar sinérgicamente con las gonadotropinas del pez incrementando el efecto de estas últimas, lo que se ve reflejado en la realización de la espermiación poco tiempo después de aplicada la HCG, como ocurrió en el presente estudio.

Los factores ambientales tales como temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH, inciden sobre el metabolismo del animal. Cada especie presenta con respecto a estos parámetros, valores máximos y mínimos dentro del cual se desenvuelven normalmente todas sus funciones fisiológicas. Valores por encima o debajo del rango óptimo provocan el estresamiento del animal, causando alteraciones en su metabolismo. A pesar de no haber sido controlados los parámetros ambientales mencionados anteriormente, no se debe descartar la posibilidad, que estos influyeron en la respuesta por parte de los reproductores hacia las hormonas suministradas en el presente estudio.

Tanto la hormona LHRHa como la HCG, ejercen su efecto sobre el desarrollo gonadal a través de los esteroides sexuales, sintetizados en el folículo ovárico bajo el estímulo de la

gonadotropina, y liberados hacia el torrente sanguíneo, de donde son captados por receptores específicos ubicados en órganos tales como el hígado (Nagahama *et al.*, 1995) ejerciendo aquí su acción.

Los niveles de cada esteroide sexual varían, siguiendo un patrón típico, durante el desarrollo gonadal, por lo que sería interesante realizar el seguimiento de estas variaciones en ejemplares que no han sido tratados hormonalmente *versus* ejemplares tratados hormonalmente con la finalidad de determinar:

- La concentración mínima de esteroides que debe estar presente en la sangre para que la vitelogénesis, maduración y ovulación se produzcan normalmente.
- El efecto que produce la inducción hormonal sobre los niveles esteroidales.
- La dosis mínima que debe ser suministrada a los reproductores para que los niveles de esteroides se incrementen hasta llegar al nivel óptimo necesario para el desarrollo gonadal.

Actualmente la técnica más eficaz para cuantificar los niveles de esteroides sexuales en el plasma sanguíneo es la denominada RIA (Radio Immuno Assay) (Prat *et al.*, 1990). Con dicha técnica se pueden realizar análisis de testosterona, estradiol-17 β y 17 α ,20 β -DP, que son los esteroides sexuales involucrados directamente en el desarrollo gonadal.

CONCLUSIONES

- La hormona LHRHa, administrada a reproductores hembras de *Centropomus nigrescens* en dosis de 97,6 a 106,2 $\mu\text{g LHRHa.Kg}^{-1}$ de peso mediante pellets de colesterol, estimula el desarrollo y vitelogénesis de oocitos perinucleolares en el *Centropomus nigrescens*.
- Reproductores de *Centropomus nigrescens* que presentan oocitos vitelogénicos, con diámetros mayores a 400 μm , responden positivamente a una dosis de 1.000 U.I. HCG.Kg⁻¹ de reproductor, obteniéndose maduración, ovulación y desove al cabo de 36-40 horas a temperaturas de 26-29 °C.
- La pobre calidad de los huevos desovados, puede deberse principalmente a la edad de los reproductores utilizados, así como la dieta no apropiada suministrada durante el período de mantenimiento previo a la realización de la inducción hormonal.
- En el *Centropomus nigrescens* un índice gonadosomático con valores de 0.51 a 0.64, es un indicativo de que la hembra se encuentra totalmente inmadura, presentando oocitos perinucleolares con diámetro menor a 100 μm .
- Una dieta con elevado contenido lipídico, provoca en el hígado la enfermedad conocida como degeneración lipoidea o infiltración de grasa. Esta enfermedad no permite la síntesis de vitelogenina por parte de las células hepáticas, afectando la realización de la vitelogénesis en los oocitos.
- La hormona HCG en dosis de 500 U.I. HCG.Kg⁻¹ de reproductor, estimula la realización de espermiación por parte de los machos de *Centropomus nigrescens*.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios del hábitat natural, a fin de determinar rangos de parámetros físico-químicos en los que se desenvuelve normalmente el *Centropomus nigrescens* y zonas en las que se localiza durante todo el año, en cantidades suficientes para ser utilizados en posteriores investigaciones.

- Estudiar el desarrollo gonadal de las hembras de *Centropomus nigrescens*, con la finalidad de:

- Establecer la variación del índice gonadosomático durante dicho proceso, y el tamaño mínimo en que la especie se encuentra sexualmente madura.

- Determinar la época del año en que se llevan a cabo los desoves, duración del ciclo reproductivo, frecuencia de desoves dentro del ciclo reproductivo, y tamaño promedio de los huevos desovados.

- Fecundidad total y fecundidad relativa.

Esto permitirá saber cual es el peso mínimo de reproductores que podrían ser utilizados en ensayos de inducción al desove, así como la época del año apropiada para capturarlos. Además se obtendrían datos preliminares con la cuales se podría comparar el efecto de la inducción hormonal, a fin de determinar con exactitud si la administración de hormonas exógenas ejerce un efecto positivo sobre la fecundidad, frecuencia de desoves y tamaño promedio de huevos.

- Analizar la composición bioquímica de los organismos que forman parte de la alimentación del *Centropomus nigrescens* y en base a los resultados obtenidos realizar una dieta que cumpla con los requerimientos necesarios de dicha especie.

- Realizar nuevos bioensayos con las hormonas LHRHa y HCG en *Centropomus nigrescens* y probar diferentes variables tales como :

- Diferentes dosis a ser suministradas, con el fin de encontrar la mínima efectiva en la inducción de la maduración y desove del *Centropomus nigrescens*.
- Temperatura óptima en la cual se obtienen las mejores respuestas por parte de los reproductores.

Paralelamente utilizar la técnica RIA para realizar el seguimiento de los niveles de testosterona, estradiol-17 β y 17 α ,20 β -DP en el plasma sanguíneo durante el ciclo de inducción hormonal.

- Trabajar con tanques de menor capacidad, preferiblemente no mayores a 1 tonelada, y ubicar 1 hembra con su(s) respectivos machos, a fin de llevar un mejor control del desarrollo gonadal y de los desoves que se realicen.
- Ensayar diferentes relaciones macho:hembra, para determinar la relación en la que se obtiene mayor porcentaje de fertilización.
- Optimizar los métodos de incubación, a través del control de las diferentes variables que afectan la tasa de eclosión, con la finalidad de mejorar el porcentaje de eclosión.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

AGER, L.A., HAMMOND, D.E. & WARE, F. 1976. Artificial spawning of snook. Southeastern Association of Fish and Wildlife Agencies, 30, 158-166.

ALMENDRAS, J.M., DUENAS, C., NACARIO, J., SHERWOOD, N.M. & CRIM, L. 1988. Sustained hormone release.III. Use of gonadotropin releasing hormone analogues to induce multiple spawnings in Sea Bass, *Lates calcarifer*. Aquaculture, 74, 97-111.

BARDACH, J.E., RYTHER, J.H. & MCLARNEY, W.O. 1986. Acuicultura crianza y cultivo de organismos marinos y de agua dulce. México, AGT Editor S.A., 741 p.

BROMAGE, N.R. & ROBERTS, R.J. 1995. Red drum and other sciaenids. En: BROMAGE, N.R. & ROBERTS, R.J.(eds.) Broodstock management and egg and larval quality. Cap. 6.

CARRILLO, M. 1997. Aspectos básicos de reproducción de teleósteos. Seminario expuesto en el Curso Internacional de Peces Marinos. Guayaquil, Ecuador. 18p.

CARRILLO, M., ZANUY, S., PRAT, F., CERDA, J., MAÑANOS, E., BROMAGE, N., RAMOS, J. & KAH, O. 1995. Nutritional and photoperiodic effects on hormonal cycles and quality of spawning in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Netherlands Journal of Zoology, 45(1-2), 204-209.

CERDA, J., CARRILLO, M., ZANUY, S., RAMOS, J. & HIGUERA, M. 1994. Influence of nutritional composition of diets on sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reproductive performance and egg and larval quality. Aquaculture, 182, 345-361.

CERDA, J., ZANUY, S., CARRILLO, M., RAMOS, J. & SERRANO, R. 1995. Short- and long-term dietary effects on female sea bass (*Dicentrarchus labrax*): seasonal changes in plasma profiles of lipids and sex steroid in relation to reproduction. Comp. Biochem. Physiol, 111 C(1), 83-91.

CERQUEIRA, V. 1990. Observações preliminares sobre o crescimento de juvenis de robalo, *Centropomus parallelus* e *Centropomus undecimalis*, com dietas naturais e 98artificiais. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianapolis, SC. 10 p.

CERQUEIRA, V.R. 1991. Testes de inducao de desova do robalo, *Centroopomus parallelus*, do litoral da ihla de Santa Catarina com Gonadotropina Coriônica Humana (HCG). En: VII Congresso Brasileiro de Enghenaria de Pesca. Instituto de Pesca, Florionópolis, Brasil, 1-8.

CERQUEIRA, V.R., MACCHIAVELLO, J.A.G. & BRUGGER, A.M. 1992. Producao de alevinos do robalo, *Centropomus parallelus* Poey, 1860, a traves de larvicultura intensiva em laboratorio. En: VI Simposio brasileiro de aquicultura, Brasil, 10 p.

CHAPMAN, P., CROSS, F., FISH, W. & JONES, K. 1982. Artificial culture of Snook. Final report for sportfish introductions project, Game and Fresh Water Fish Commission, Florida. 36 p.

CHAVEZ, H.R. 1963. Contribución al conocimiento de la biología de los robalos, Chucumite y Constantino (*Centropomus* spp) del Estado de Veracruz, México. Ciencia, 22(5), 141-161.

CHIRICHIGNO, N. 1974. Clave para identificar los peces marinos del Perú. Instituto del Mar de Perú, 44: 238-244.

DONALDSON, E.M.& HUNTER, G.A. 1983. Induced final maturation, ovulation, and spermiation in cultured fish. En: HOAR, W.S., RANDALL, D.J. & DONALDSON, E.M. Fish Physiology, Vol. IX (B), Cap. 7.

FOSTIER, A., JALABERT, B., BILLARD, R., BRETON, R. & ZOHAR, Y. 1983. The gonadal steroids. En: HOAR, R.S, RANDALL, D.J. & DONALDSON, E.M. Fish physiology, Vol.IXA, Cap 7.

FUTAGAWA, M. 1997. Fish culture division, monthly report, the month of april 1997. JICA-CENAIM Project, 1-10.

GARCIA, L.M. 1989. Dose-dependent spawning response of mature female sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch), to pelleted luteinizing hormone releasing hormone analogue (LHRHa). *Aquaculture*, 77, 85-96.

GERALD, R.A., ROSS, R. 1991. *Fishes of the Tropical Eastern Paific*. Bathurst, NSW, Crawford House Press Pty Ltd, 332 p.

GOETZ, F.W. 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes. En: HOAR, W.S., RANDALL, D.J. & DONALDSON, E.M. *Fish physiology*, Vol IXB, Cap. 3.

GUARTATANGA, R., SCHWARTZ, L., WIGGLESWORTH, J.M. & GRIFFITH, D.R.W. 1993. Experimental intensive rearing of red drum (*Sciaenops ocellatus*) in Ecuador.

HARVEY, B.J. & HOAR, W.S. 1979. *Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces*. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo. 48p.

HIBIYA, T. 1982. *An Atlas of fish histology, normal and pathological features*. Sttugart, New York, 147 p.

HIGBY, M. & BEULIG, A. 1988. Effects of stocking density and food quantity on growth of young snnok, *Centropomus undecimalis*, in aquaria. *Florida Sci.*, 51(3/4): 163-171.

HOPSON, J. & WESSELLS, N. 1990. Animal development. En: HOPSON, J. & WESSELLS, N. *Essentials of biology*, Cap. XVI.

IDLER, D.R. & NG, T.B. 1983. Teleost gonadotropins: isolation, biochemistry, and

function. En: HOAR, W.S., RANDALL, D.J. & DONALDSON, E.M. Fish physiology, Vol. IX A., Cap. 5.

LAGLER, K.F., BARDACH, J.E., MILLER, R.R. & MAY, D.R. 1977. Ictiología. Mexico, AGT Editor S.A., 489 p.

LAM, T.J. 1983. Environmental influences on gonadal activity. En: En: HOAR, W.S., RANDALL, D.J. & DONALDSON, E.M. Fish physiology, Vol IXB, Cap. 2.

LAM, T.J. 1985. Induced spawning in fish. En: LEE, C.S. & LIAO, I.C. (Eds) Reproduction and culture of milkfish. Taiwan, 14-56.

LILEY, N.R. & STACEY, N.E. 1983. Hormones, pheromones, and reproductive behavior in fish. En: HOAR, W.S., RANDALL, D.J. & DONALDSON, E.M. Fish physiology, Vol IXB, Cap. 1.

LUCHINI, L. 1990. Revisión y compilación sobre técnicas de reproducción inducida. Boletín de Red regional de acuicultura (Bogotá-Colombia), 4 (1), 3-8.

MARSHALL, A.R. 1958. A survey of the snook fishery of Florida, with studies of the biology of the principal species, *Centropomus undecimalis* (Bloch). State of Florida Brd. Conserv., Techn. Ser., 22, 1-39.

MATSUYAMA, M., TAKEUCHI, H., KASHIWAGI, M. HIROSE, K. & KAGAWA, H. 1995. Induced gonadal development and spawning in immature red sea bream *Pagrus major* with LHRH-a administration in different ways during winter season. Fisheries Science, 61(3), 472-477.

MATTY, A.J. 1985. Fish Endocrinology, 267 p.

MEDINA, X. 1995. Estudio básico sobre robalo (pisces: Centropomidae). Tesis de grado previa a la obtención del título de Acuicultor. Escuela Superior Politécnica del Litoral,

Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Ecuador, 103 p.

MUHLIA, A., ARVIZU, J., RODRIGUEZ, J., GUERRERO, D., GUTIERREZ, F.J., & ALMAZAN, M.A. 1994a. Sinopsis de información biológica, pesquera y acuacultural acerca de los robalos del género *Centropomus* en México. Programa de evaluación de recursos naturales del centro de investigaciones biológicas del noroeste, SC., México. 148 p.

MUHLIA, A., ARVIZU, J., RODRIGUEZ, J., GUERRERO, D., GUTIERREZ, F.J., & ALMAZAN, M.A. 1994b. Desarrollo científico y tecnológico del cultivo del róbalo. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., La Paz, Baja California Sur, 66 p.

MURAD, F. & HAYNES, R. 1981. Hormonas y antagonistas hormonales. En: GOODMAN, L., GILMAN, A. & GOODMAN, A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Sexta edición. Cap. 12.

MUSHIAKE, K., KAWANO, K., SAKAMOTO, W. & HASEGAWA, I. 1994. Effects of extended daylight on ovarian maturation and HCG-induced spawning in yellowtail fed moist pellets. *Fisheries Science*, 60(6),647-651.

MYLONAS, C.C., MAGNUS, Y., GISSIS, A., KLEBANOV, Y. & ZOHAR, Y. 1996. Application of controlled-release, GnRHa-delivery system in commercial production of white bass x striped bass hybrids (sunshine bass, use captive broodstocks. *Aquaculture*, 140, 265-280.

NAGAHAMA, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. En: HOAR, W.S., RANDALL, D.J. & DONALDSON, E.M. *Fish Physiology*. Volume IX Part A, Cap. 6.

NAGAHAMA, Y. 1987. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zoological science*, 4, 209-222.

NAGAHAMA, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.*, 38: 217-229.

NAGAHAMA, Y., YOSHIKUNI, M., YAMASHITA, M., TOKUMOTO, T. & KATSU, Y. 1995. Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Current topics in Developmental Biology*, 30: 103-145.

NG, T.B. & IDLER, D.R. 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes. En: HOAR, W.S., RANDALL, D.J. & DONALDSON, E.M. *Fish Physiology*. Volume IX Part A, Cap. 8.

NOGUEIRA, A.L. 1991. Cultivo de Camorin, *Centropomus undecimalis* Bloch, 1792 (Pisces, Centropomidae) em ambiente aquidulcícola 1. Efeito de predação sobre tilápia, *Oreochromis niloticus*. Tesis para obtención de título de Master en Aquicultura, Programa de pós-graduacao em aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, 36 p.

PATÍÑO, R. 1995. Manipulations of the Reproductive System of Fishes by Means of Exogenous Chemical. Texas Cooperative Fish and Wildlife Research Unit, Texas. 30 p.

PIPER, R., MCELWAIN, I., ORME, L., MCCRAREN, J., FOWLER, L.G. & LEONARD, J.R. 1992. Fish hatchery management. U.S. Fish and Wildlife Service, USA,

PRAT, F., ZANUY, S., CARRILLO, M., MONES, A. & FOSTIER, A. 1990. Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroid of sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 78, 361-373.

REDDING, J.M. & PATÍÑO, R. 1993. Reproductive physiology. En: EVANS, D.E. *The physiology of fishes*, Cap. 16.

RIVAS, L.R., 1986. Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia*, 3, 579-611.

ROBERTS, R.J. & BULLOCK, A.M. 1989. Nutritional Pathology. En: HALVER, J.E. (Ed) Fish nutrition. San Diego, California, 424-475.

ROCHA, I. & OKADA Y. 1980. Experimento de policultivo entre curima (*Mugil brasiliensis* Agassiz, 1829) e camorin (*Centropomus undecimalis* Bloch, 1792) em viveiros estuarinos (Itamaracá-Pernambuco). En: Simposio Brasileiro de Aquicultura, 1, Recife. Anais... Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciencias, p.163-173.

RUIZ, M.F. 1993. Recursos pesqueros de las costas de México, su conservación y manejo socio-económico. 3° Edición. México, Limusa, 229-234.

SHAFLAND, P.L., KOEHL, D.H. 1979. Laboratory rearing of the common snook. Proc. Ann. Cont. S.E., Assoc. Fish & Wild, 425-431.

SHEPHERD, C.J. & BROMAGE, N.R. 1988. Intensive fish farming, 404 p.

SINGHAGRAIWAN, T. & DOI, M. 1993. Induced spawning and larval rearing of the red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* at the eastern marine fisheries development center. Thai Mar. Fish. Res. Bull., 4, 45-57

STACEY, N.E. 1984. Control of the timing of ovulation by exogenous and endogenous factors. En: POTTS, G.W. & WOOTTON, R.J. Fish reproduction: strategies and tactics. Cap. 12.

TAKASHIMA, F. & HIBIYA, T. 1995. Atlas of Fish Histology, segunda edición. p. 134-153.

THOMAS, P. 1994. Hormonal control of final oocyte maturation in sciaenid fishes. Perspectives in comparative endocrinology, p. 619-625.

TUCKER, J. 1987. Snook and Tarpon Snook Culture and Preliminary Evaluation for Comercial Farming. The Progressive Fish-Culturist, 49, 49-57.

TUCKER, J.W., MATTHEW, P., LANDAU & FAULKNER, B.E. 1985. Culinary value and composition of wild and captive common snook *Centropomus undecimalis*. Division of applied biology, Harbor Branch Foundation, 48.

VASQUEZ, O. 1988. A review of potentially cultivable marine species in Latin American waters. En: Producción de larvas y juveniles de especies marinas. Coquimbo, 31-37.

VOLPE, A.V. 1959. Aspects of the biology of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch) of Southwest, Florida. Florida State Board Conservation, technical Service, 31, 5-37.

ZOHAR Y., TOSKY M., PAGELSON G. & FINKELMAN Y. 1989. Induction of spawning in the Gilthead Seabream, *Sparus aurata*, using (D-Ala⁶-Pro⁹-Net)-LHRH: comparison with the use of HCG. The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, 41(3), 105-113.

ZOHAR, Y. 1989. Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. En : SHILO, M. & Sarig, S. Fish Culture in Warm Water Systems: Problem and Trends. Florida, p. 65-119

ZOHAR, Y., PAGELSON, G., GOTHILF, Y., DICKHOOF, W., SWANSON, W., DUGUAY, S., GOMBOTZ, W., KOST, J. & LANGER, R. 1990. Controlled release of Gonadotropin releasing hormones for the manipulation of spawning in farmed fish. Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 17, 908-909.

ANEXOS

Anexo 1. Promedio mensual de la temperatura, pH y Oxígeno disuelto medidos durante el bioensayo.

Tanque de 10 TM (Primer Grupo)			
Mes	Temperatura (°C)	pH	Oxígeno Disuelto (mg.l ⁻¹)
Febrero	27,1±1,5	8,12±0,21	6,29±0,82
Marzo	27,2±2,6	8,07±0,29	6,07±1,23
Abril	25,7±2,9	8,16±0,26	6,40±1,11
Mayo	27,1±1,9	8,26±0,23	6,57±1,47
Junio	27,0±1,1	8,12±0,30	6,41±0,78

Tanque de 18 TM (Segundo Grupo)			
Mes	Temperatura (°C)	pH	Oxígeno Disuelto (mg.l ⁻¹)
Febrero	27,9±2,1	7,74±0,52	6,61±1,23
Marzo	27,5±1,5	7,66±0,94	6,44±1,43
Abril	26,1±2,3	8,05±0,31	6,77±1,19
Mayo	27,4±0,7	7,96±0,51	6,87±1,43
Junio	27,3±1,7	7,89±0,47	6,56±1,15