



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIDAD MULTIDISCIPLINARIA DE DOCENCIA E
INVESTIGACIÓN, CAMPUS SISAL**

**Efecto de la hormona GnRH α y Pimozide sobre la
producción de esperma en machos de robalo blanco
Centropomus undecimalis (BLOCH, 1792)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN MANEJO SUSTENTABLE DE
ZONAS COSTERAS**

P R E S E N T A :

ROSA ELENA MARTINEZ CERDA



**DIRECTOR DE TESIS:
M. en C. ADOLFO SANCHEZ ZAMORA**

Sisal, Yucatán, México 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos

1. Datos del alumno

Rosa Elena Martínez Cerda

+52 55 43565001

remc93@hotmail.com

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Campus Sisal

Licenciatura en Manejo Sustentable de Zonas Costeras

310247874

2. Datos del jurado

| | |
|---|--|
| Director de Tesis Secretario | M. en C. Adolfo Sánchez Zamora Facultad de Ciencias, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Campus Sisal, UNAM |
| Presidente | Dr. Carlos Rosas Vázquez Facultad de Ciencias, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Campus Sisal, UNAM |
| Vocal | M. en C. Jaime Suárez Bautista Facultad de Ciencias, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Campus Sisal, UNAM |
| Suplente | Dr. Jorge Alberto López Rocha Facultad de Ciencias, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Campus Sisal, UNAM |
| Suplente | Dr. Daniel Arceo Carranza Facultad de Ciencias, Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, Campus Sisal, UNAM |

3. Datos del trabajo

Efecto de la hormona GnRHa y Pimozide sobre la producción de esperma en machos de robalo blanco *Centropomus undecimalis* (BLOCH,1792)

65 p

2019

“El mundo es un lugar peligroso, no por causa de los que hacen el mal, sino por aquellos que no hacen nada por evitarlo”

Albert Einstein

El presente trabajo está dedicado a

Mis padres Ma. Elena Cerda y Manuel Martínez,
quienes me ha apoyado a lo largo de toda mi formación
tanto personal como profesional.

Gracias a ustedes es que he logrado esta meta.

Esta tesis es para ustedes.

A mi hermanos Diana y Adán,
por el apoyo brindado,
por lo consejos dados y por su cariño.

Han sido un ejemplo a seguir.

A mi sobrina Aidé,
quien me ha apoyado y
regalado felicidad en muchos momentos.

Gracias Familia, LOS AMO

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi universidad, a la Universidad Nacional Autónoma de México por haber permitido formarme y darme las bases necesarias para realizarme como profesionista. Porque una vez puma, nunca dejas de serlo.

Al M. en C. Adolfo Sánchez Zamora, por su gran apoyo durante todo este proceso. Por las enseñanzas brindadas durante toda mi licenciatura, por su orientación desde que empecé en este camino y por confianza para lograr esta gran meta.

Al M. en C. Rafael Eduardo Pacheco Góngora, por su valiosa asesoría que fue fundamental en la elaboración de este trabajo y por su apoyo cuando lo necesité durante mi carrera.

Al profesor Jaime Suárez Bautista, por su apoyo y contribución durante la realización de este trabajo y durante mi formación académica.

A todo mi comité de tesis por el tiempo dedicado a la revisión y contribución de este documento: al Dr. Carlos Rosas Vázquez, al Dr. Daniel Arceo Carranza y al Dr. Jorge Alberto López Rocha, quienes durante mi licenciatura me aportaron gran cantidad de saberes.

Agradecimientos personales

A mi madre y maestra de vida, Ma. Elena Cerda Román, quien me ha brindado su apoyo incondicional durante toda mi vida y quien siempre ha confiado en mí. Es por ello mamá que esta tesis es fundamentalmente para ti.

A mi padre, Manuel Martínez Jiménez, quien me ha apoyado durante toda mi vida y quien es una pieza fundamental en mi vida. Tus consejos y sabiduría, fueron ecos que retumbaron para hoy en día estar aquí.

A mis hermanos, Diana y Adán Martínez, quienes me ha apoyado y se han preocupado por mi. A ti hermanita por ser un ejemplo a seguir y a ti hermano, por tus regaños y consejos para la vida.

Al licenciado César Quetzín Ponce Osorio, por ser mi compañero durante esta travesía, quién estuvo en las buenas y en las malas apoyándome, brindándome consejos y dándome aliento para concluir esta meta.

A la profesora Claudia Durruty por sus comentarios para mejorar el presente trabajo y por su apoyo cuando lo necesité durante mi estancia en Sisal.

A la séptima generación (generación 2013), quienes aportaron aprendizajes durante la carrera.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| ÍNDICE DE TABLAS | IX |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | X |
| Resumen..... | XII |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 Aspectos generales..... | 1 |
| 1.2 Cultivo de organismos | 2 |
| 1.3 <i>Centropomus undecimalis</i> (robalo blanco, robalo común) | 4 |
| 2. Antecedentes | 6 |
| 2.1 Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas..... | 6 |
| 2.2 Tratamientos hormonales..... | 8 |
| 3. Hipótesis 1 | 13 |
| 3.1 Objetivos | 14 |
| 3.1.1 Objetivo general..... | 14 |
| 3.1.2 Objetivos específicos | 14 |
| 3.2 Materiales y métodos | 15 |
| 3.2.1 Origen de los organismos..... | 15 |
| 3.2.2 Alimentación..... | 15 |
| 3.2.3 Calidad del agua..... | 16 |
| 3.2.4 Diseño experimental | 16 |
| 3.2.5 Toma de muestras y evaluaciones espermáticas | 17 |
| 3.2.6 Análisis estadístico..... | 21 |
| 3.3 Resultados | 22 |
| 4. Hipótesis 2 | 25 |
| 4.1 Objetivos | 26 |
| 4.1.1 Objetivo general..... | 26 |
| 4.1.2 Objetivos específicos | 26 |
| 4.2 Materiales y métodos | 27 |
| 4.2.1 Origen de los organismos..... | 27 |
| 4.2.2 Alimentación..... | 27 |
| 4.2.3 Calidad del agua..... | 28 |
| 4.2.4 Diseño experimental | 28 |
| 4.2.5 Toma de muestras y evaluaciones espermáticas | 30 |
| 4.2.6 Análisis estadístico..... | 31 |
| 4.3 Resultados | 32 |
| 5. Discusión..... | 34 |
| 6. Conclusiones | 41 |

7. Recomendaciones 42

8. Bibliografía 43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Movilidad (%) de muestras de semen obtenidas antes de la aplicación de tratamientos y al día 7 y 14 después de aplicación (media±error estándar).....23

Tabla 2. Volumen, movilidad y concentración de muestras de esperma para el tratamiento de GnRHa sobre machos de *C. undecimalis*. (*) diferencias significativas ($p<0.05$) entre control inicial y hormona a las 72 hrs; (**) diferencias significativas ($p<0.05$) entre hormona a las 24 y 48 hrs y entre hormona a las 24 y 72 hrs.....32

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. a) Anestesia de organismo con aceite de clavo; b) Obtención de gametos a través de biopsia con cánula de plástico..... | 17 |
| Figura 2. Diseño experimental del primer experimento..... | 18 |
| Figura 3. a) Extracción de muestra de semen de <i>C. undecimalis</i> ; b) Muestras conservadas en frío para posteriores evaluaciones espermáticas..... | 19 |
| Figura 4. Evaluación de la movilidad espermática en laboratorio..... | 20 |
| Figura 5. Valores promedio (media \pm error estándar) del volumen de esperma en microlítrios por tratamiento en machos de robalo blanco <i>C. undecimalis</i> . PIM: pimozide; GnRH α : hormona análoga de la liberadora de gonadotropinas; COMB: GnRH α -PIM; control: solución salina..... | 22 |
| Figura 6. Valores promedio (media \pm error estándar) de la concentración espermática en células por mililitro. PIM: pimozide; GnRH α : hormona análoga de la liberadora de gonadotropinas; COMB: GnRH α -PIM; control: solución salina. (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$) en el tratamiento T1 entre el día 0 y 14; (**) indica diferencias significativas ($p < 0.05$) en el tratamiento T2 entre el día 0 y 14..... | 24 |
| Figura 7. Diseño experimental del segundo ensayo..... | 29 |

Abreviaturas

DA: Dopamina

DOM: Domperidone

GCH: Gonadotropina Coriónica Humana

GnRH_a: Hormona análoga liberadora de gonadotropinas

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

GTH: Gonadotropinas

LH: Hormona luteinizante

LHRH_a: Hormona análoga Liberadora de la Hormona Luteinizante

MET: Metaclopramide

mg: Miligramos

PIM: Pimozide

T: Testosterona

Resumen

Muchas especies de peces en cautiverio presentan disfunciones sexuales; en machos de *Centropomus undecimalis* existe baja cantidad de esperma comparado con organismos silvestres. La utilización de hormonas exógenas, es frecuente y eficaz en para estimular la reproducción en cautiverio. La GnRHa (hormona análoga de la liberadora de gonadotropinas) es utilizada para estimular la espermiación en peces, sin embargo, la coadministración de GnRHa con algún antagonista de dopamina ha sido utilizado con éxito, ya que la dopamina ejerce acción inhibitoria en el eje reproductivo de peces. El presente estudio evaluó el efecto de GnRHa y el PIM (pimozide) sobre la espermiación de *C. undecimalis* a distintos tiempos después de la aplicación. Se realizaron dos experimentos; evaluando la calidad espermática en base al volumen (microlítros), concentración (cel/ml) y movilidad (porcentaje). En el primer experimento, la calidad espermática fue evaluada a los siete y 14 días post inyección, suministrando PIM (5 mg/kg) (T1), GnRHa (75 µg/kg) (T2), (GnRHa-PIM) (T3) y control (cloruro de sodio al 0.9%) (T4). Se observó un ligero aumento de volumen para T2, mientras para T1 un ligero decremento sin diferencias significativas ($p>0.05$); la movilidad fue $>50\%$ en T1 y T2 mientras en la concentración se observaron cambios significativos; de acuerdo con esto, se sugiere ausencia de dopamina. El segundo experimento, evaluó GnRHa (75 µg/kg), a períodos cortos. La evaluación de las características espermáticas se realizó al día 1 (24hrs), 2 (48 hrs) y 3 (72 hrs). El mayor volumen se observo al tercer día siendo significativamente ($p<0.05$) mayor con su inicial; la movilidad más alta se obtuvo al día tres y la mayor concentración al día uno, con diferencias significativas ($p<0.05$) entre el día uno con dos y tres. El tratamiento con GnRHa mejoró el volumen y la concentración de esperma. Palabras clave: GnRHa, dopamina, volumen, movilidad, concentración.

1. Introducción

1.1 Aspectos generales

La pesca y la acuicultura, son dos actividades cuya función principal es el abastecimiento de alimentos para la población. Por una parte, la pesca es la actividad principal para la obtención de recursos marinos mientras la acuicultura contribuye cada vez más a la disponibilidad de estos recursos. La pesca marina provee aproximadamente el 49% y la pesca continental un 7%; la acuicultura continental suministra un 28% y la marina representa una menor proporción (16%) de la producción mundial (Bouvet, 2018).

A nivel mundial, debido al crecimiento y expansión en la pesca, su intensificación ha provocado sobrepesca (Bouvet, 2018). Se estima que en 2013 a nivel mundial, el 68.5 % de poblaciones de peces marinos fueron explotadas a nivel de sostenibilidad biológica y un 31.5% están sobreexplotadas, con consecuencias ecológicas negativas, pero si las poblaciones sobreexplotadas llegaran a recuperarse, podrían garantizar la sostenibilidad del recurso (FAO, 2016).

La acuicultura es una manera eficiente de producir proteína animal de calidad, que aporta a la seguridad alimentaria y que reduce la presión en los recursos pesqueros (Flores & Euán, 2004), ya que proporciona alrededor de la mitad de los alimentos para consumo humano y va aumentando el número de especies marinas cultivadas en el mundo (Lorenzen *et al.*, 2013), así, del porcentaje mundial total atribuido a la industria acuícola (44%), la mayor proporción se dedica a la producción de peces de agua dulce y en menor cantidad a peces marinos (67% en conjunto), seguida de la

producción de moluscos (21%), crustáceos de agua dulce y salada (9% conjunto), entretanto, la cantidad restante (3%) corresponde a la producción de otros organismos (Bouvet, 2018).

Es una actividad de rápido crecimiento; para 2007, de las 250 especies cultivadas, el 97% se introdujo el siglo pasado y 20% en la última década (Lorenzen *et al.*, 2013) y aproximadamente el 35% en productos pesqueros proceden de esta actividad para consumo mundial (Figueras & Novoa, 2014), sin embargo, el crecimiento de la acuicultura, se debe, al control del ciclo de vida de algunas especies y en particular la reproducción (Bouvet, 2018) a pesar de su mayor reto: la diversificación y la reproducción (Muñoz *et al.*, 2009), lo que contribuiría a cerrar ciclos reproductivos de especies cultivadas (Moyano, 2013).

A pesar de que en México, el cultivo de peces marinos a nivel comercial se encuentra en producción a nivel laboratorio y no a nivel industrial, presenta un gran potencial (Escárcega, 2014), lo cual requiere de más estudios que permitan desarrollar por completo la tecnología de cultivo de distintas especies.

1.2 Cultivo de organismos

Para domesticar una especie y lograr su producción a nivel industrial, se necesita conocer su ciclo biológico y controlar el ciclo reproductivo (Mylonas *et al.*, 2010; Rosales & Acevedo, 2011), pues a pesar del progreso en la reproducción de algunas especies en cautiverio, siguen existiendo problemas, como en el abastecimiento de poblaciones silvestres para reproductores (Moyano, 2013); por lo que la industria acuícola está limitada en parte, por carencia de reproductores y cuando se tienen, pueden presentar problemas, particularmente en su reproducción encontrando en algunas especies desove inusual o si sucede presentan una fecundidad baja (Guzmán *et al.*, 2011).

Por otro lado, las condiciones ambientales presentes causan alteraciones sobre las poblaciones en cautiverio de algunas especies, en comparación con las silvestres, mostrando modificaciones por ejemplo en su ciclo reproductivo. Diversas especies no logran reproducirse durante el primer año en cautiverio mientras que otras no lo realizan nunca; no obstante, existen estudios enfocados a la reproducción sexual, y al ser un proceso cíclico posibilita la transmisión de información genética entre generaciones, conservación de especies y diversidad biológica (Muñoz-Cueto, 2005).

En el caso de algunos peces marinos en cautiverio, presentan disfunciones sexuales en ambos sexos. Por ejemplo, algunos machos, completan la espermatogénesis, los espermatozoides maduran y los niveles de andrógenos en plasma son normales pero la producción de espermatozoides es menor comparada con aquellos organismos capturados del medio natural (Mylonas & Zohar, 2001; Guzmán *et al.*, 2011). La calidad del esperma es un requisito para la conservación (Kowalski *et al.*, 2006), por lo tanto, la investigación de este factor, es de suma importancia para el cultivo de organismos; la calidad puede ser evaluada en base a distintas características frecuentemente medidas como la capacidad de fertilización, volumen, densidad, movilidad, composición y osmolaridad del plasma seminal (Aramli *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2015). La estimulación de producción de esperma en teleósteos en cautiverio es una necesidad y cuando no se logra naturalmente, puede realizarse mediante algún tratamiento hormonal (Pankhurst, 1994).

Dentro de las especies que presentan problemas en su reproducción bajo cultivo, se encuentra el robalo blanco (*Centropomus undecimalis*), una especie marina con importancia económica en el país, que presenta disfunciones sexuales en ambos sexos acarreado problemas para su cultivo a gran escala.

Los robalos (*Centropomidae*), son especies de gran valor en el mercado nacional y con una alta demanda y precio en México (Escárcega, 2014). Dadas sus propiedades alimenticias, su valor elevado en mercados locales y regionales y el fácil acceso por comunidades pesqueras, es una especie muy valorada por los pescadores artesanales del Golfo de México. La pesca de esta especie, es de subsistencia y una de las principales economías para las comunidades pesqueras a lo largo del Golfo de México (Perera-García *et al.*, 2008). Esta especie sobre sale por sus volúmenes de captura en Campeche y en otras regiones del Golfo de México, ya que en todos los estados costeros de esta región ha aumentado el esfuerzo de pesca y se ha mostrado que no es igual al de sus capturas, de este modo, se sospecha que su abundancia está afectada por una explotación excesiva, pues se extrae gran cantidad y al parecer no tiene tiempo de recuperación (Caballero-Chávez, 2012) considerándolo en estado de aprovechamiento máximo (Arreguín-Sánchez & Arcos-Huitrón, 2011).

1.3 *Centropomus undecimalis* (robalo blanco, robalo común)

Existen 12 especie del género *Centropomus* distribuidas en ambos lados del continente americano; en el océano Atlántico seis (*Centropomus undecimalis*, *C. ensiferus*, *C. mexicanus*, *c. pectinatus*, *C. parallelus*, y *C. poeyi*) y en el océano Pacífico seis (*C. armatus*, *C. unionensis*, *C. medius*, *C. robalito*, *C. nigrescens*, y *C. viridis*), de las cuales la especie de *C. undecimalis* es la especie más grande y de más rápido crecimiento (Alvarez-Lajonchère & Tsuzuki, 2008).

Es una especie eurihalina, hermafrodita protándrico y diádroma (Yanes-Roca, 2006) y se distribuye en mares tropicales desde Carolina del Norte (EU) hasta Río de Janeiro (Brasil), a temperaturas de 25-31° C. Vive en aguas no muy profundas de fondos arenosos, blandos y

fangosos (Caballero-Chávez *et al.*, 2014); en aguas costeras, esteros, lagunas y agua dulce. Se alimenta de peces, crustáceos (camarones, jaibas) y moluscos (caracoles, almejas) en etapa adulta, mientras que las larvas y juveniles se alimentan de zooplancton principalmente (Vergara-Chen, 2014).

Los robalos americanos necesitan de agua salada para desove, desarrollo embrionario y primeras etapas larvales (Alvarez-Lajonchère & Tsuzuki, 2008). En algunos lugares, su época de reproducción inicia en primavera y termina a inicios del otoño, con mayor actividad de mayo a agosto (Caballero-Chávez *et al.*, 2014). Los individuos, pueden vivir en cuerpos de agua dulce o en el mar y una vez maduros se dirigen a zonas cercanas a la costa a desovar; una vez hecho esto, algunos regresan de nuevo al sitio original donde habitaban. Los huevos, flotan en la superficie y eclosionan en el mar; una vez eclosionados, las larvas crecen convirtiéndose en juveniles que pueden regresar a los cuerpos de agua dulce o salobre auxiliados por las mareas, y ahí viven en manglares o en zonas de pastos durante las primeras etapas hasta alcanzar la madurez sexual y estos nuevos individuos repiten el ciclo de desove (INAPESCA, 2012).

2. Antecedentes

2.1 Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas

En todos los sistemas de cultivo de peces, los individuos deben sincronizarse con las variables ambientales (luz, temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, pH, disponibilidad de nutrientes, entre otros) y entre sí para que la reproducción sea exitosa, por lo que, el sistema nervioso es de gran importancia en el control de la reproducción ya que es el encargado de integrar las señales externas (ambientales) e internas (hormonales) y llevar las señales a efectores endocrinos mediante acciones moduladoras (Muñoz-Cueto, 2005). Para el funcionamiento apropiado de los procesos reproductivos en peces, se llevan a cabo múltiples relaciones en el eje cerebro-hipófisis-gónadas, el cual mediante sistemas sensoriales y receptores específicos, recibe las señales y de este modo el cerebro de peces incorpora la información ambiental y neuroendocrina que entra a vías efectoras y libera neurohormonas (neuropéptidos, monoaminas y aminoácidos neurotransmisores), las cuales regulan la actividad de la hipófisis mediante la estimulación o inhibición de la síntesis y secreción de gonadotropinas (GTH I u hormona vitelogénica y GTH II o maduracional) (Miranda *et al.*, 2013). La GnRH, un decapeptido producido en el hipotálamo (y otras regiones del cerebro) y que está presente en protocordados, invertebrados y vertebrados, es el estimulador primordial en la secreción de las gonadotropinas y la reproducción en peces, así, las gonadotropinas después de ser estimuladas por esta neurohormona, generan reacciones endocrinas que conllevan a la reproducción, regulando la gametogénesis y esteroidogénesis en gónadas, por lo que la actividad de la hipófisis y su secreción hormonal, está mediada por factores neurohormonales que son sintetizados en neuronas específicas del cerebro y liberadas en la hipófisis (Muñoz *et al.*, 2009).

La dopamina es una monoamina que inhibe funciones tanto en el cerebro como en la hipófisis, mediante la disminución de la síntesis y liberación de la GnRH, baja regulación de los receptores e interfiere las vías de transducción de las señales perjudicando la secreción de GTHs, lo que conduce a un bloqueo en el desarrollo reproductivo de algunas especies (Dufour *et al.*, 2005). Los efectos de este elemento cerebral se han mostrado en peces de agua dulce y en algunos peces marinos como en el *Mugil cephalus* (Aizen *et. al.*, 2005) y el *Solea senegalensis* (Guzmán *et al.*, 2011), por lo que se piensa, que pudieran estar influyendo en adultos machos de robalo blanco.

El sistema nervioso central, como se mencionó anteriormente, tiene una gran capacidad de recibir e integrar distintos tipos de señales, entre ellas, están los estímulos provenientes de diferentes tipos de estrés, los cuales clasifica y después genera una respuesta diferente para cada uno de ellos, no obstante, este sistema no lo hace de manera aislada sino trabaja en conjunto con el sistema endócrino, el sistema inmune y el comportamiento (Flores-Quintana, 2002).

El estrés desencadena una serie de eventos fisiológicos a manera de respuesta cuando se distingue un factor estresante, el cual se transmite al cuerpo mediante el sistema nervioso central que actúa sobre neuronas y hormonas; el aumento de algunas de estas hormonas genera varias respuestas entre ellas se encuentra el uso de energía, que puede verse involucrado en la capacidad reproductiva, por lo tanto, el estrés puede afectar la reproducción de distintas maneras. Puede acelerar o inhibir los eventos reproductivos pero van a depender de la intensidad y la duración del factor estresante y de la etapa del ciclo de vida del organismo en que se presente. Por ejemplo, en etapas tempranas de crecimiento puede afectar la determinación o diferenciación del sexo; en la maduración, afecta la ovulación o espermiación perjudicando la calidad de los gametos y los niveles de esteroides sexuales, mientras en la etapa de desove puede alterar el comportamiento

(selección de pareja o cortejo), asimismo, otros factores de estrés en peces pueden afectar la reproducción; como la disponibilidad y calidad de alimento (debido al estrés por restricción calórica, aunque esto se ha visto sólo en mamíferos), los patógenos y los parásitos (costo de energía que requieren) (Schreck, 2010).

2.2 Tratamientos hormonales

Tratamientos con hormonas exógenas, resultan eficaces para la estimulación de la reproducción, inducción al desove o sincronización de la liberación de gametos de ambos sexos en peces cultivados (Rurangwa, 2004), ya que en algunas especies de peces, este tipo de tratamientos hormonales es la única forma de controlar su reproducción de manera segura, pues al actuar sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, puede estimular de manera más equilibrada los eventos reproductivos (Król *et al.*, 2009).

Una de las hormonas exógenas más utilizada frecuentemente, es la hormona análoga de la liberadora de gonadotropinas (GnRH_a) (Mylonas *et al.*, 2017); utilizada tanto en machos como en hembras, se ha reportado ser exitosa en algunas especies, no obstante, ha sido ineficaz para algunas otras. La falta de eficacia es asociada a la acción inhibitoria de la dopamina (DA) endógena, lo que ha generado la necesidad de co-administrar GnRH_a con un antagonista de DA como Domperidone, Metaclopramide o Pimozide (PIM) (Holland *et al.*, 2002; Aizen *et al.*, 2005; Guzmán *et al.*, 2011; Rhody, 2014), de manera exitosa, para eliminar su inhibición y que la GnRH_a pueda ejercer su función en el eje reproductivo.

Diversos estudios se han realizado con la administración de la GnRH_a sola; tal es el caso de machos del fletán del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*), en el cual se estudió el efecto de

la GnRHa sobre la calidad espermática antes de la espermiación y al final de la temporada de desove, en el cual, la hormona suministrada fue útil para adelantar, mejorar y extender el periodo de duración de producción de esperma (Vermeirssen *et al.*, 2004). También, en machos del esturión (*Acipenser persicus*), la administración de dicha hormona, se realizó con el fin de observar los cambios en características del esperma durante su temporada de reproducción, (Aramli *et al.*, 2013).

Otros estudios con esta hormona pero en adición con algún antagonista de DA, han sido realizados en ambos sexos. En la lubina *Dicentrarchus labrax*, se suministró GnRHa y PIM para conocer el efecto de la dopamina en la regulación de factores endocrinos, regulación de maduración final de ovocitos y ovulación, pero la administración de GnRHa sola fue suficiente para inducir a la maduración y desove de ovocitos y la falta de efecto de PIM, descartó inhibición dopaminérgica (Prat *et al.*, 2001). En el caso de la dorada roja (*Pagrus major*), los efectos de GnRHa fueron estudiados junto con DOM (domperidone) sobre la maduración sexual de hembras, en el cual la administración de GnRHa logró inducir al inicio de la pubertad (Kumakura *et al.*, 2003).

Dados los problemas de maduración sexual de la anguila europea (*Anguilla anguilla*), se suministró GnRHa con PIM y T (testosterona); se identificó presencia de dopamina que bloquea el inicio de la pubertad (Vidal *et al.*, 2004). En la perca plateada (*Bidyanus bidyanus*), se sugirió la presencia de dopamina por lo que se suministró GnRHa y DOM para inducción al desove pero DOM no mejoró el efecto de GnRHa (Levavi-Sivan *et al.*, 2004).

En machos del pez basa (*Pangasius bocourti*), se suministró GCH, GnRHa y DOM para inducir a la espermiación; por lo que la producción natural de esperma de esta especie se puede mejorar con GCH y el uso de GnRHa+DOM no fue exitoso (Cacot *et al.*, 2003).

En el pez plano (*Solea senegalensis*), se investigó la existencia de DA en el eje reproductivo mediante la influencia de GnRHa y PIM, donde el PIM fue efectivo para estimular la espermatogénesis, maduración testicular y producción de espermatozoides encontrando presencia de dopamina (Guzmán *et al.*, 2011).

En el caso de los machos de lubina rayada (*Morone saxatilis*), la aplicación de GnRHa, PIM (pimozide) y T (testosterona), se llevó a cabo para inducir al desarrollo testicular precoz donde el tratamiento combinado de T+GnRHa estimuló el desarrollo testicular de juveniles (Holland *et al.*, 2002). A pesar de ser frecuentemente utilizada, la GnRHa, también se ha utilizado en combinación con GCH. Especies del género *Morone* presentan disfunciones reproductivas en ambos sexos por lo que se creó un híbrido a partir de la lubina rayada (*Morone saxatilis*) y de la lubina blanca (*Morone chrysops*); se indujo al desove con GCH en ambos sexos sin éxito pero al aplicar GCH+GnRHa fue efectivo para la ovulación y calidad de huevos en hembras, mientras en machos la administración de GnRHa fue efectiva para inducir la espermiación (Mylonas & Zohar, 2001).

En el caso del robalo blanco, existen estudios que han contribuido a generar información base para un cultivo exitoso a gran escala; sobre alimentos (Reyes *et al.*, 2004; Freire & Pinto, 2017), capacidad digestiva (Alvarez-González *et al.*, 2010; Fragoso *et al.*, 2013), parámetros poblacionales (Perera-García *et al.*, 2008; Gómez-Ortiz *et al.*, 2015), biología reproductiva (Yanes-Roca, 2006; Caballero-Chávez, 2011; Perera-García *et al.*, 2011; Muller & Taylor, 2012; Rhody *et al.*, 2013) cultivo a diferentes densidades (Zarza-Zarza *et al.*, 2006; Barreno, 2015) y evaluaciones económicas para su cultivo (Polonía *et al.*, 2016) a pesar de estos avances, aún hay pocos estudios dedicados a abordar la baja producción de alevines.

Estudios realizados en *Centropomus undecimalis*, también han utilizado esta hormona (GCH) en ambos sexos para obtención de larvas (Reyes *et al.* 2015).

Tiersch *et.al.* (2004) evaluó métodos de almacenamiento en frío y criopreservación del esperma de robalo, mediante una serie de evaluaciones espermáticas con las que después se evaluó la eclosión y sobrevivencia de huevos; se administró GCH y GnRHa, mostrando que el esperma fresco tuvo mayor capacidad de fertilización que el esperma criopreservado. En machos de *C. undecimalis*, se hizo otro ensayo, suministrando GnRHa (100 µg/kg) y PIM (1000 µg/kg) para inducir al desove espontáneo evaluar características del esperma, sugiriendo ausencia de DA (Rhody, 2014). Por otro lado, en machos y hembras de robalo blanco se suministró GnRHa en organismos capturados de su medio natural y mantenidos en cautiverio, obteniendo desove de hembras (Contreras-Sánchez *et al.*, 2015). Igualmente, en reproductores maduros de *C. undecimalis*, se suministró sGnRHa para la obtención de un método para desove y aumento en el número de larvas (Ibarra-Castro *et al.*, 2011).

En otra especie de la misma familia *Centropomidae*, el robalo chucumite (*C. pararellus*), se administró GnRHa para la evaluar de la calidad espermática, sin embargo, se observó que no es necesaria la aplicación de hormonas (Contreras-García *et al.*, 2011).

Estudios basados en la aplicación de hormonas sobre robalo blanco (*C. undecimalis*), se han enfocado más a hembras, sin embargo, uno de los principales problemas en esta especie es que los machos en cautiverio producen poco volumen de semen en relación a los silvestres. Un aspecto importante es que los animales nacidos y criados en cautiverio, deberían presentar menos problemas en la actividad reproductiva, pues se esperaría que respondieran mejor en comparación con organismos silvestres al estar cada vez mas cerca de la domesticación, no obstante este problema sigue existiendo. Existe la hipótesis de que uno de los factores principales implicados en

esta alteración es la presencia de la dopamina, la cual pudiera estar evitando la acción de la hormona liberadora de gonadotropinas. Por esa razón el presente estudio fue dirigido a evaluar los efectos de la GnRH α y pimozide (PIM) sobre la producción de esperma de machos de *C. undecimalis* nacidos en condiciones de laboratorio.

3. Hipótesis 1

Dado que existe dopamina como factor inhibitorio en la reproducción de algunas especies de peces en cultivo, la aplicación GnRHa en co-administración con inhibidores de la dopamina como pimozide ha resultado exitosa para estimular la espermiación en algunas especies. Se sospecha que la dopamina, está presente en la espermiación en machos de robalo blanco (*Centropomus undecimalis*), por lo que la aplicación de la GnRHa en co-administración con PIM tendría un efecto positivo sobre el volumen, movilidad y concentración espermática.

3.1 Objetivos

3.1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de GnRHa y PIM solos o en combinación sobre la producción de esperma en machos de robalo blanco nacidos en cautiverio, en etapa reproductiva.

3.1.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto del inhibidor de la dopamina PIM a los 7 y 14 días después de la aplicación hormonal sobre las características espermáticas de volumen, movilidad y concentración

Evaluar el efecto de GnRHa a los 7 y 14 días después de la inyección sobre el volumen, movilidad y concentración de esperma

Evaluar el efecto del inhibidor de dopamina PIM en combinación con GnRHa sobre el volumen, movilidad y concentración espermática

3.2 Materiales y métodos

En julio de 2014, se suministró la hormona análoga de la liberadora de gonadotropinas (GnRH α) tanto sola como en combinación con el antagonista de dopamina, Pimozide, a machos reproductores nacidos en cautiverio.

3.2.1 Origen de los organismos

Los machos de la especie de robalo (*C. undecimalis*) fueron obtenidos del área de Estanques de Engorda de Peces Marinos de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) Sisal UNAM, en el estado de Yucatán. Los machos obtenidos de la UMDI pertenecientes a la generación F1, se utilizaron en la época en que han madurado otros robalos en la UMDI, Sisal por lo que se consideró que estaban en temporada de maduración. A los robalos se les extrajo esperma mediante canulación; tenían una edad de cuatro años; un peso promedio de 3.3 ± 0.1 kg y una longitud total promedio de entre 63 cm y 84.5 cm. Para poder diferenciar a los individuos, los peces fueron marcados con microchips de la marca Biomark®. Previo al experimento, se mantuvieron, en estanques de 20,000 litros con recambio de agua de mar del 30% diariamente, a una densidad máxima de 3 kg/ m³.

3.2.2 Alimentación

Los organismos fueron alimentados tres veces por semana, una vez al día, con trozos de pescado fresco de sardina azul (*Opisthonema oglinum*), sardina escamuda (*Harengula jaguana*) y bonito (*Euthynnus alletteratus*) complementado con capsulas de hígado de bacalao a saciedad.

3.2.3 Calidad del agua

Previo y durante el experimento, los organismos se mantuvieron en agua de mar con las siguientes características generales promedio: salinidad 36 ‰, temperatura 27.6 ° C y oxígeno disuelto, 6.8 mg/L.

Durante el periodo experimental, se tomaron los parámetros físico químicos, una vez por día (salinidad, temperatura y oxígeno disuelto) con ayuda de un equipo multiparámetro de la marca Hach® y se hizo recambio diario de agua de aproximadamente 50% con flujo abierto.

3.2.4 Diseño experimental

Un total de 24 organismos fueron inicialmente divididos en cuatro tratamientos, destinando seis individuos por tratamiento, sin embargo, la identificación en laboratorio posterior a la extracción de muestra en campo, mostró la presencia de hembras que habían revertido el sexo, lo cual disminuyó el número de organismos a 20 y quedó el diseño de la siguiente manera: seis individuos en el tratamiento PIM, seis en el tratamiento con GnRHa, tres organismos en el tratamiento combinado y cinco para el grupo control, las hembras identificadas fueron sacadas del experimento. Todos los individuos marcados con chips se colocaron en dos estanques de 20,000 litros; en cada tanque se distribuyeron los cuatro tratamientos y estos fueron: Pimozide PIM (R&D SYSTEMS®) (T1), Hormona análoga de la liberadora de gonadotropinas: Sigma [des-Gly¹⁰, D-Ala⁶]-LH-RH ethylamide acetate salt hydrate ≥97% (HPLC) (T2), tratamiento combinado (GnRHa-PIM) (T3) y un control donde sólo se aplicó suero fisiológico (Solución CS PiSA, cloruro de sodio al 0.9%) (T4) (Figura 2). Para el tratamiento de PIM (T1), se suministró una dosis única, la cual fue de 5 mg/kg para cada organismo, tanto de tratamiento de PIM sólo, como combinado

(T3). Para el tratamiento T2 con GnRH α , se administró 75 μ g/kg para el tratamiento sólo y combinado (T3). En tanto, para el control, se inyectó solamente solución salina al 0.9%.



Figura 1. a) Anestesia de organismo con aceite de clavo; b) Obtención de gametos a través de biopsia con cánula de plástico.

3.2.5 Toma de muestras y evaluaciones espermáticas

La obtención de muestras seminales se realizó al día 0, 7 y 14 después de la aplicación de la hormona.

La metodología para obtención de muestras, se realizó de acuerdo a Contreras-Sánchez et al., (2015). Previo a la toma de muestras, los organismos fueron anestesiados en agua de mar con aceite de clavo a una concentración de 0.1ml/l L y los animales fueron sedados aproximadamente

en un minuto (Figura 1), después de la obtención de muestra, se colocaron en agua limpia recuperándose en menos de tres minutos. La toma de muestra se realizó mediante la obtención de una biopsia gonádica con una cánula de plástico de 1.6 mm de diámetro externo y se realizó la succión de manera bucal, evitando variaciones en la toma de las muestras para lo cual, se intentó que las muestras se obtuvieran de la misma manera en todos los experimentos.

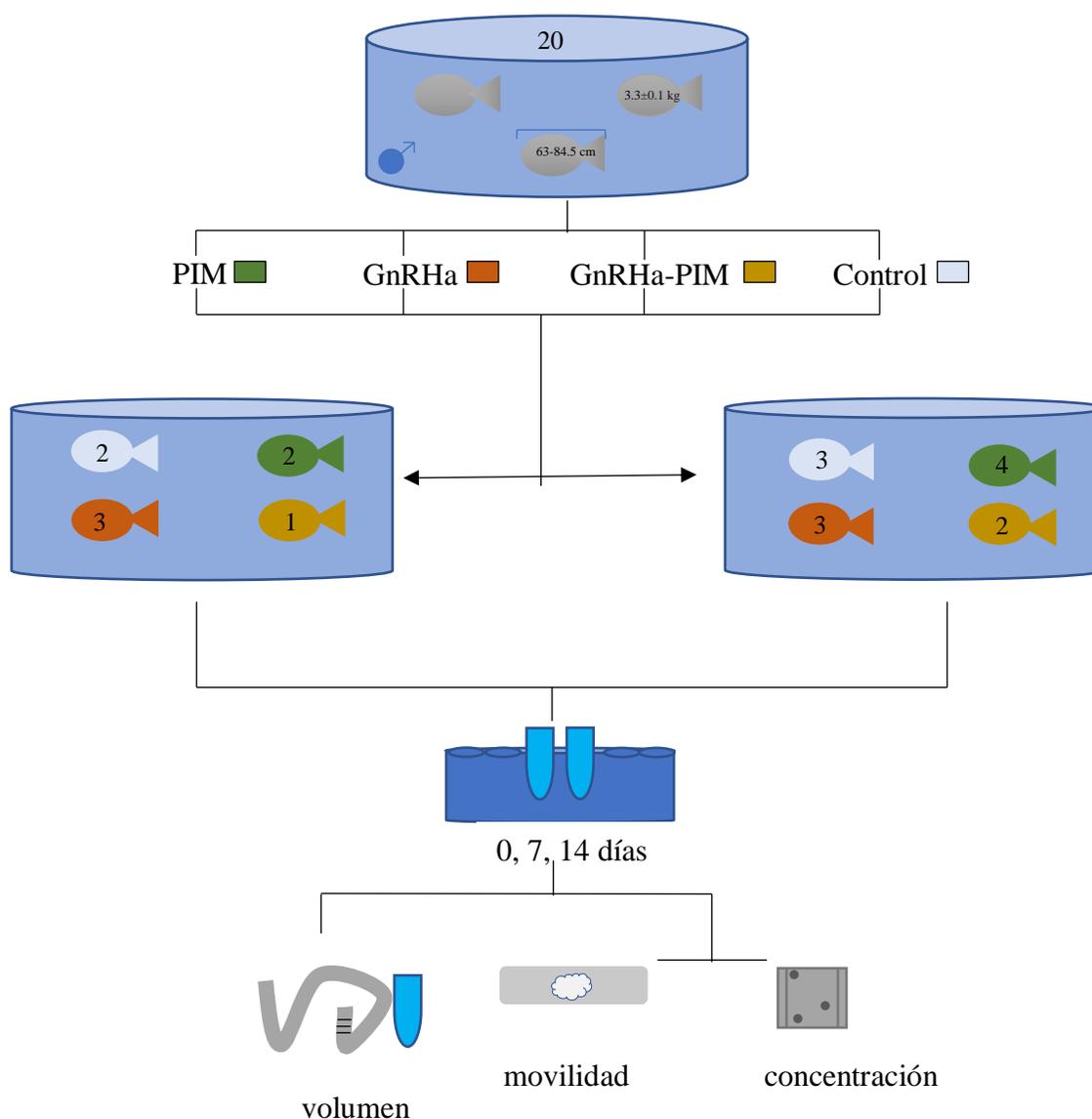


Figura 2. Diseño experimental del primer experimento.

Se obtuvieron dos muestras por cada organismo y fueron conservadas en frío por no más de tres horas, en tubos eppendorf de 1.5 ml a temperatura de 2°C hasta concluir con las evaluaciones espermáticas (Figura 3). Previamente se evaluó el tiempo para que permanecieran el semen en el tubo, sin pérdida importante de las características biológicas y se encontró que en tres horas como máximo podría estar el semen en frío a 2°C.

Para determinar la evaluación de la calidad de los espermatozoides, se tomaron en cuenta distintas evaluaciones del semen: volumen (μl), movilidad (%) y concentración (cel/ml) de cada una de las muestras obtenidas (Sorbera *et al.* 1996).

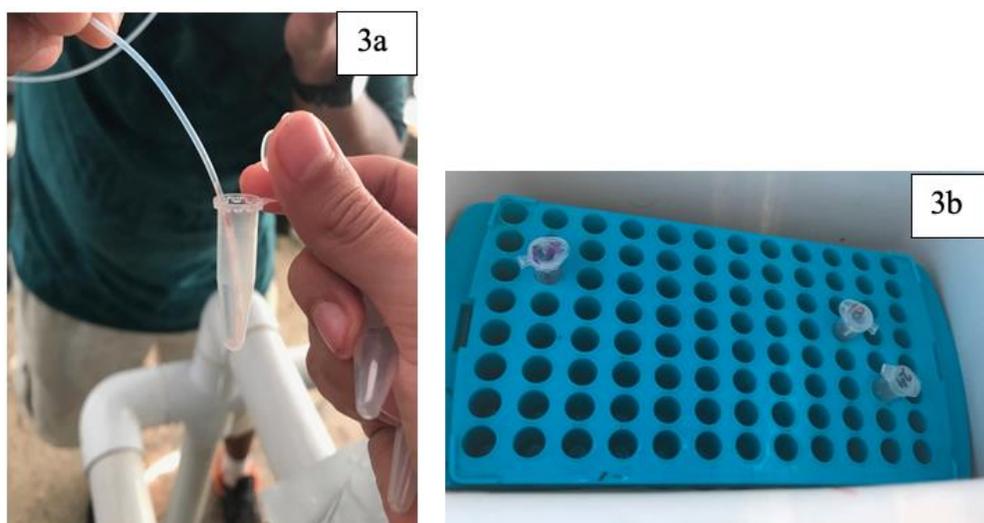


Figura 3. a) Extracción de muestra de esperma de *C. undecimalis*; b) Muestras conservadas en frío para posteriores evaluaciones espermáticas.

Evaluación del volumen. La evaluación de la cantidad de volumen obtenido, se realizó de manera directa utilizando una cánula graduada en microlitros.

Evaluación de la movilidad. La movilidad (%) de células espermáticas, fue observada en cada una de las muestras por separado. Para ello, se colocó 1 μl de esperma y se le agregó 1 μl de

agua de mar sobre un portaobjetos (para activación de estos), el cual se observó en el microscopio óptico (Labomed®) a 10X y 40X (Figura 4). Se observó la movilidad y clasificó en una escala de 0 a 100% (Guzmán et al., 2011).

Evaluación de la concentración. La concentración espermática (cel/ml) se evaluó utilizando un microscopio óptico (Labomed®) a 40X, dicha evaluación se realizó en términos generales de la siguiente manera:

A causa de la alta concentración de espermatozoides, las muestras fueron diluidas en agua dulce (μl de esperma total/ 20 μl de agua dulce), para la evaluación de la concentración. De cada una de las muestras diluidas, se tomó 1 μl de la dilución, se colocó en la cámara Neubauer y se procedió al conteo con ayuda de un contador de mano. Todas las anotaciones fueron recabadas en una bitácora de trabajo.



Figura 4. Evaluación de la movilidad espermática en laboratorio.

3.2.6 Análisis estadístico

Se llevaron a cabo los análisis con ayuda del paquete estadístico R (versión R 3.4.0) sobre las características espermáticas de volumen y concentración de células.

Los datos del experimento, no cumplieron con los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia por lo que se optó por los análisis estadísticos no paramétricos.

Se realizó un primer análisis para conocer diferencias existentes en cada tratamiento a lo largo de los días mediante pruebas de Wilcoxon pareado y un segundo análisis para diferencias entre los tiempos de muestreo y los tratamientos mediante análisis de Kruskal-Wallis.

3.3 Resultados

En la figura 5, se muestran los resultados obtenidos de volumen de esperma para el experimento uno. En el día 0 se muestra un control inicial del volumen de esperma obtenido de los organismos previo a aplicación de tratamientos. Se observa gráficamente, que en T2 hubo un ligero aumento conforme pasaron los días con $14 \pm 3.6 \mu\text{l}$ antes de la aplicación hormonal, $15.2 \pm 4.8 \mu\text{l}$ a los siete días y $16.7 \pm 3.5 \mu\text{l}$ a los 14 días, contrario a T1 el cual disminuyó con el paso del tiempo con $14.8 \pm 6.7 \mu\text{l}$ para el día 0, $13.5 \pm 4.5 \mu\text{l}$ y $11.7 \pm 2.2 \mu\text{l}$ para el día siete y 14 respectivamente, ambos tratamientos fueron más altos respecto a T4 durante todo el período experimental. No se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en cada tratamiento a lo largo de los días, ni para los días entre tratamientos.

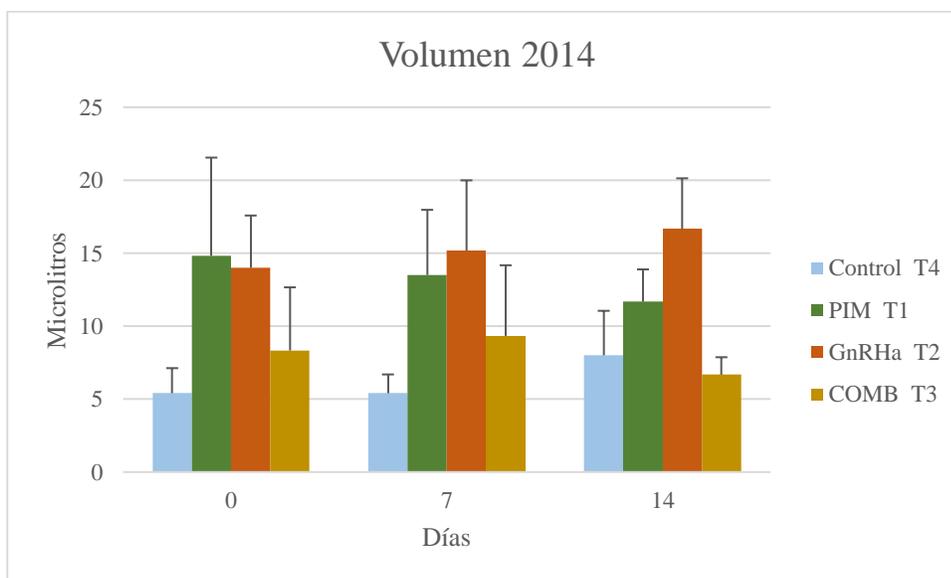


Figura 5. Valores promedio (media \pm error estándar) del volumen de esperma en microlitros por tratamiento en machos de robalo blanco *C. undecimalis*. PIM: pimozide; GnRHα: hormona análoga de la liberadora de gonadotropinas; COMB: GnRHα-PIM; control: solución salina.

Se observa que T3, decreció al final del experimento, mientras que el tratamiento control aumentó, a pesar de la diferencia visual, los cambios no son significativos ($p>0.05$).

De acuerdo a la movilidad (tabla 1), todos los tratamientos en los distintos tiempos de muestreo, presentaron una movilidad mayor al 30%. T1 y T2, fueron los tratamientos que presentaron valores más altos durante todo el periodo experimental; el tratamiento T1 a los 7 días con $53\pm 15\%$ y al día 14 con $63\pm 8\%$ mientras T2 a los 7 días con $53\pm 11\%$ y $73\pm 12\%$ a los 14 días. T3, disminuyó hacia el final del experimento con $33\pm 13\%$ respecto a su movilidad inicial de $40\pm 20\%$, similar a su movilidad al día 7 ($40\pm 31\%$), pero en este día se presenta una alta dispersión que al parecer se asocia a la variabilidad de cada individuo. Por su parte, T4 mantuvo sus valores similares a lo largo del tiempo experimental (32 ± 12 , 40 ± 16 y $40\pm 13\%$ respectivamente).

Tabla 1. Movilidad (%) de muestras de semen obtenidas antes de la aplicación de tratamientos y al día 7 y 14 después de aplicación (media \pm error estándar).

| | Día 0 | Día 7 | Día 14 |
|---------|------------|------------|------------|
| Control | 32 ± 12 | 40 ± 16 | 40 ± 13 |
| PIM | 57 ± 14 | 53 ± 15 | 63 ± 8 |
| GnRHa | 63 ± 15 | 53 ± 11 | 73 ± 12 |
| COMB | 40 ± 20 | 40 ± 31 | 33 ± 13 |

En la figura 6 se muestra la concentración espermática y se observa que todos los tratamientos presentaron un aumento del día 0, 7 y 14, inclusive el control, pero no todos con

cambios significativos. Pareciera que los organismo aumentaron la concentración espermática independiente del tratamiento utilizado.

A los siete días, T1 fue el que presentó la mayor concentración de células espermáticas ($7.16 \pm 2.56 \times 10^9$ cel/ml), seguido por T3 (6.12 ± 3.58^9 cel/ml).

Para los 14 días, T3 fue el presentó el mayor número de células con $9.53 \pm 4.73 \times 10^9$ cel/ml pero sin diferencias significativas ($p > 0.05$) con los demás tratamientos ni tampoco a lo largo de los días del mismo tratamiento. El tratamiento T1 mantuvo un valor similar (7.43 ± 1.15^9 cel/ml) al de los siete días y T2, presentó el valor más alto con respecto a su valor inicial y con respecto a los siete días, con 8.32 ± 1.99^9 cel/ml. Tanto el tratamiento T1 como T2, presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre su muestreo inicial y los 14 días.

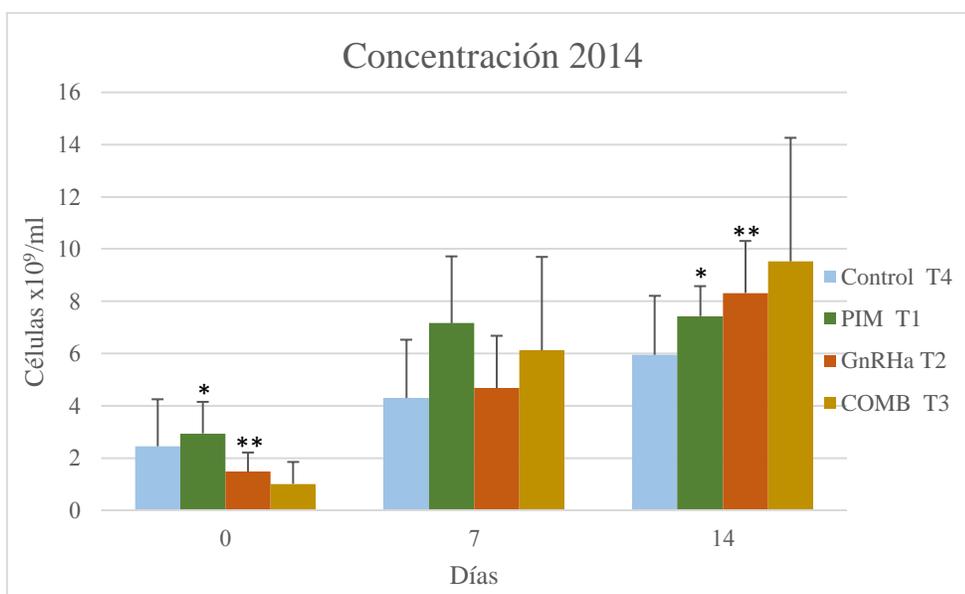


Figura 6. Valores promedio (media \pm error estándar) de la concentración espermática en células por mililitro. PIM: pimozide; GnRHa: hormona análoga de la liberadora de gonadotropinas; COMB: GnRHa-PIM; control: solución salina. (*) indica diferencias significativas ($p < 0.05$) en el tratamiento T1 entre el día 0 y 14; (**) indica diferencias significativas ($p < 0.05$) en el tratamiento T2 entre el día 0 y 14.

4. Hipótesis 2

Debido a la ausencia de la dopamina en el experimento anterior, que se evaluó mediante la aplicación de Pimozide y que el efecto se midió a largo plazo (14 días), se vio en la necesidad de conocer el efecto de la hormona a corto plazo (días), para lo cual se realiza un segundo experimento, donde se espera que la aplicación de la hormona sola, tenga algún efecto positivo en el aumento de volumen del semen, movilidad y número de células espermáticas respecto de las medidas iniciales.

4.1 Objetivos

4.1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de GnRHa sobre la producción de esperma a corto plazo, en machos de *C. undecimalis* nacidos en cautiverio, en etapa reproductiva.

4.1.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto de GnRHa a las 24, 48 y 72 horas, después de la administración hormonal sobre el volumen, movilidad y concentración de esperma de reproductores

4.2 Materiales y métodos

En agosto de 2015 donde se suministró la hormona análoga de la liberadora de gonadotropinas (GnRHa) en machos reproductores nacidos en cautiverio.

4.2.1 Origen de los organismos

Los machos reproductores de *Centropomus undecimalis* pertenecientes a la generación F1, fueron obtenidos del área de Estanques de Engorda de Peces Marinos de la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación (UMDI) Sisal UNAM, en el estado de Yucatán. De acuerdo con la temporada en que se utilizaron los organismos, se consideró que se encontraban en temporada de maduración ya que coincide con la maduración de otros robalos de esta unidad. A los robalos, les fue extraído semen mediante canulación. Tenían una edad de cuatro años y un peso promedio de 3.3 ± 0.1 kg y una longitud total promedio de entre 63 cm y 84.5 cm. Los peces fueron marcados con microchips de la marca Biomark® para poder diferenciar a los individuos. Previo al experimento, se mantuvieron, en estanques de 20,000 litros con recambio de agua de mar del 30% diario, a una densidad máxima de 3 kg/ m³.

4.2.2 Alimentación

Previo al experimento, los organismos fueron alimentados tres veces por semana, una vez al día, con trozos de pescado fresco de sardina azul (*Opisthonema oglinum*), sardina escamuda (*Harengula jaguana*) y bonito (*Euthynnus alletteratus*); dicho alimento fue complementado con capsulas de hígado de bacalao y dado a saciedad. Durante el tiempo experimental, los organismos

no fueron alimentados, pues no aceptaron el alimento al cambiarlos a un tanque más chico (1700 litros) como sucede frecuentemente con esta especie.

4.2.3 Calidad del agua

De manera general, previo y durante el experimento, los organismos se mantuvieron en agua de mar. Previo al experimento los parámetros fueron en promedio: salinidad 36‰, temperatura 27.5° C y oxígeno disuelto, 6.8 mg/L.

Durante el periodo experimental, se tomaron los parámetros físico químicos (salinidad, temperatura y oxígeno disuelto) diariamente por la mañana y por la tarde con ayuda de un equipo multiparámetro de la marca Hach® y se hizo recambio diario de agua de aproximadamente 50% con flujo abierto. Durante el experimento, los parámetros se mantuvieron en promedio: salinidad 35.5‰, temperatura 27.6° C y oxígeno disuelto, 6.7 mg/L

4.2.4 Diseño experimental

Debido a que en el experimento anterior no se vio efecto del Pimozide, se decidió investigar el efecto de la hormona GnRH α a corto plazo: 24 hrs (día 1), 48 hrs (día 2) y 72 hrs (día 3). El planteamiento de este segundo experimento, se debe a que el uso rutinario de esta hormona durante la época de reproducción de la especie en cautiverio se utiliza en períodos cortos para la obtención de esperma.

Para este ensayo, se aplicó GnRH α (Sigma [des-Gly¹⁰, D-Ala⁶]-LH-RH ethylamide acetate salt hydrate \geq 97% (HPLC) a dosis de 75 μ g/kg a nueve machos adultos. Previo de la aplicación de la hormona, se tomaron los valores iniciales de volumen, movilidad y concentración de estos

organismos, posteriormente fueron colocados en tinas de 1700 L de capacidad y a cada una se le suministró flujo abierto de agua de mar y aireación constante (Figura 7).

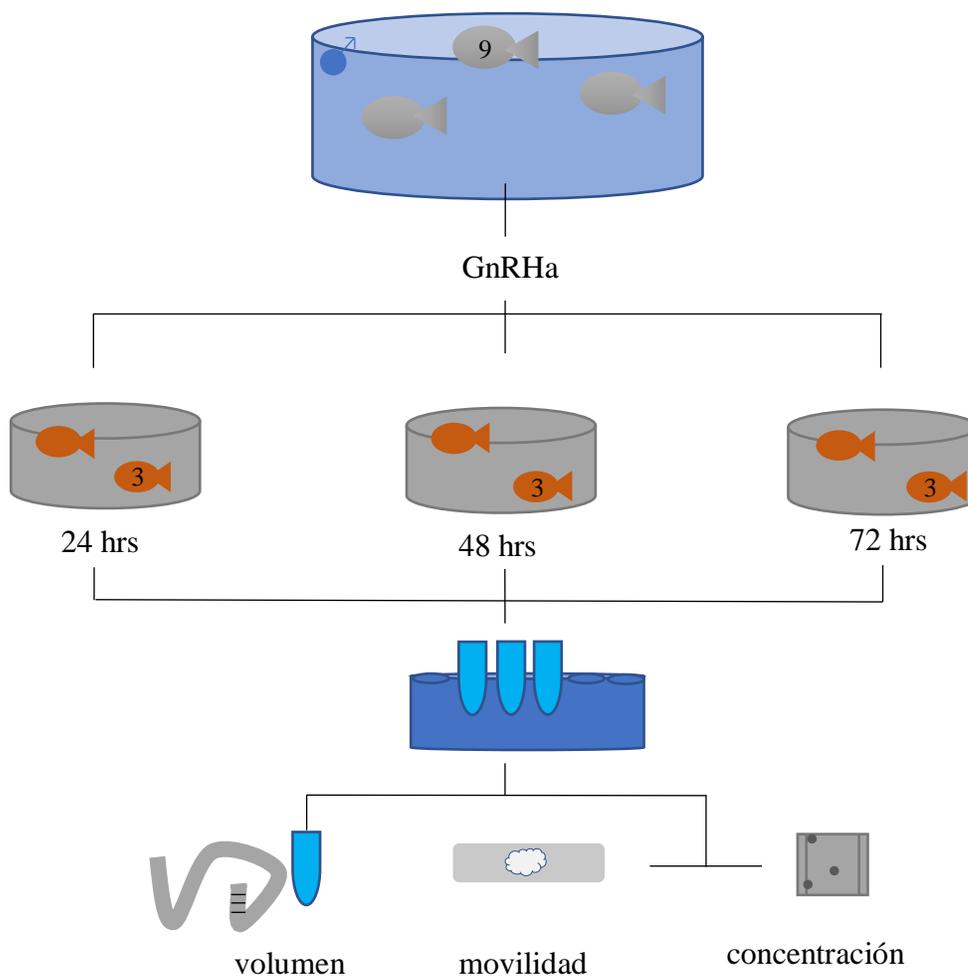


Figura 7. Diseño experimental del segundo ensayo.

4.2.5 Toma de muestras y evaluaciones espermáticas

La obtención de muestras seminales se realizó a las 24 hrs (día 1), 48 hrs (día 2) y 72 hrs (día 3), y se obtuvieron tres muestras por individuo.

La metodología para obtención de muestras, se realizó según Contreras-Sánchez et. al., (2015). Antes de la toma de muestras, los organismos fueron anestesiados en agua de mar con aceite de clavo a una concentración de 0.1ml/l L; los animales fueron sedados aproximadamente en un minuto y después de la obtención de muestra, se colocaron en agua limpia recuperándose en menos de tres minutos. La toma de muestra se realizó mediante la obtención de una biopsia gonádica con una cánula de plástico de 1.6 mm de diámetro externo y se realizó la succión de manera bucal, evitando variaciones en la toma de las muestras para lo cual, se intentó que las muestras se obtuvieran de la misma manera (Figura 1).

Las muestras fueron conservadas en frío por no mas de tres horas, en tubos eppendorf de 1.5 ml a temperatura de 2°C hasta concluir con las evaluaciones espermáticas. Previamente se evaluó el tiempo para que permanecieran el semen en el tubo sin pérdida importante de las características biológicas y se encontró que en tres horas como máximo podría estar el semen en frío a 2°C (Figura 3).

Para determinar la evaluación de la calidad de esperma se llevó a cabo mediante distintas características espermáticas: volumen (μ l), movilidad (%) y concentración (cel/ml) de cada una de las muestras obtenidas (Sorbera *et al.* 1996).

Evaluación del volumen. La evaluación se realizó colocando la muestra extraída de semen en un portaobjetos y se midió el volumen con una micropipeta de 0 a 20 o de 0 a 100 μ l.

Evaluación de la movilidad. El porcentaje de células móviles fue observada en cada una de las muestras por separado. Para ello, se colocó 1 μ l de esperma y se le agregó 1 μ l de agua de

mar sobre un portaobjetos (para activación de estos), el cual se observó en microscopio (Labomed[®]) a 10X y 40X (Figura 4). Se observó la movilidad y clasificó en una escala de 0 a 100% (Guzmán et.al., 2011)

Evaluación de la concentración. La concentración espermática (cel/ml) se evaluó utilizando un microscopio óptico (Labomed[®]) a 40X. Debido la alta concentración de espermatozoides, las muestras fueron diluidas en formol al 4% (μl de esperma total/999 μl de formol); de cada una de las muestras diluidas, se tomó 1 μl de la dilución, se colocó en la cámara Neubauer y se procedió al conteo con ayuda de un contador de mano y todas las anotaciones fueron recabadas en una bitácora de trabajo.

4.2.6 Análisis estadístico

Se llevaron a cabo los análisis con ayuda del paquete estadístico R (versión R 3.4.0) sobre las características espermáticas de volumen y concentración de células.

Los datos del experimento, no cumplieron con los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia por lo que se optó por los análisis estadísticos no paramétricos.

Se realizó un análisis de Wilcoxon para identificar diferencias entre los días del muestreo y un segundo análisis para conocer las diferencias en cada tiempo de muestreo y su valor inicial, mediante pruebas de Wilcoxon pareado.

4.3 Resultados

En la tabla 2, se presentan los resultados de las características espermáticas medidas en el segundo ensayo.

De acuerdo al volumen de esperma, se observa que la mayor cantidad obtenida después de la aplicación de GnRHa sola, se presentó al día tres ($14 \pm 8 \mu\text{l}$), seguido por el día uno ($9 \pm 2 \mu\text{l}$) y al último por el día dos ($8 \pm 2 \mu\text{l}$).

Tabla 2. Volumen, movilidad y concentración de muestras de esperma para el tratamiento de GnRHa sobre machos de *C. undecimalis*. (*) diferencias significativas ($p < 0.05$) entre control inicial y hormona a las 72 hrs; (**) diferencias significativas ($p < 0.05$) entre hormona a las 24 y 48 hrs y entre hormona a las 24 y 72 hrs

| | Control Inicial | Hormona 24 hrs | Control Inicial | Hormona 48 hrs | Control Inicial | Hormona 72 hrs |
|---|-----------------|--------------------|-----------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| Volumen (μl) | 15 ± 4 | 9 ± 2 | 8 ± 1 | 8 ± 2 | $6 \pm 2^*$ | $14 \pm 8^*$ |
| Movilidad (%) | 76 ± 13 | 69 ± 16 | 20 ± 10 | 45 ± 19 | 47 ± 18 | 76 ± 15 |
| Concentración ($\times 10^9/\text{ml}$) | 20 ± 5.17 | $20 \pm 7.93^{**}$ | 6.14 ± 3.17 | $3.09 \pm 1.83^{**}$ | 6.59 ± 2.74 | $2.05 \pm 0.69^{**}$ |

Los organismos del día uno, tuvieron una disminución en la cantidad de volumen de esperma con respecto a su muestreo inicial, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$). En el caso de los individuos del día dos con su respectivo muestreo inicial, los valores se mantuvieron similares. Por otra parte, los individuos del día tres y su inicial, mostraron un ligero aumento del volumen de semen, con diferencias significativas

($p < 0.05$) entre ambos. Los volúmenes iniciales no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre ellos.

De acuerdo a la movilidad, el valor más alto se observó al día tres (76 ± 15 %) y su inicial fue de 47 ± 18 %, seguido del día uno (69 ± 16 %) con su inicial de 76 ± 13 %, mientras el valor más bajo se presentó al día dos (45 ± 19 %) y su inicial de 20 ± 10 %.

La concentración por su parte, decreció conforme pasaron los días del período experimental. La concentración más alta se dio al día uno, con $20 \times 10^{10} \pm 7.93 \times 10^9$ cel/ml, similar a su muestreo inicial ($20 \times 10^{10} \pm 5.17 \times 10^9$ cel/ml); el día dos presentó una concentración de $3.09 \pm 1.83 \times 10^9$ cel/ml pero decreció respecto a su valor inicial. El día tres, presentó el número de células más bajo del período experimental, con $2.05 \times 10^9 \pm 0.69 \times 10^8$ cel/ml y disminuyó con respecto a su muestreo inicial. Sólo se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$), entre el día uno y dos y entre el día uno y tres.

5. Discusión

El problema sobre la falta de la producción de esperma en *C. undecimalis* en cautiverio se puede atribuir a factores ambientales no presentes en esas condiciones; así, al parecer hay factores en el ambiente que no se pueden dar en cautiverio, por ejemplo, su migración para reproducción, la presión hidrostática y otros, que ocasiona cambios metabólicos, los cuales pueden influir en la ausencia o presencia por ejemplo de la dopamina (Vidal *et al.*, 2004). Por ejemplo en el *Solea senegalensis* (Guzmán *et al.*, 2011) o en la *Tinca tinca* (Podhorec *et al.*, 2012), se encontró presencia de dopamina que afecta su eje reproductivo. Aún en organismos nacidos y criados bajo condiciones controladas, como es el caso del robalo blanco, siguen existiendo problemas reproductivos llevándonos a pensar que uno de los factores implicados pudiera ser la dopamina, evidenciando su acción inhibitoria, por lo que este problema no sólo se presenta en organismos capturados en la naturaleza para reproducción en cautiverio (Sánchez Zamora A. comunicación personal). La acción de la dopamina está presente en distintas clases de vertebrados pero en distinta intensidad y se ha conservado ya sea en la pubertad o en la edad adulta, por lo que la presencia de la dopamina sobre la regulación de la ovulación y espermiación se ha demostrado en algunos teleósteos (Dufour *et al.*, 2005).

Por lo anterior, el primer experimento fue dirigido a la evaluación de un antagonista de la dopamina, el pimozide. Esperando que tuviera algún efecto positivo sobre la espermiación de machos de robalo blanco, evidenciando la presencia dopaminérgica.

En el presente trabajo, los tratamientos de T1 y T2 fueron los que presentaron un mayor volumen esperma pero sin diferencias significativas ($p > 0.05$) a lo largo del tiempo, similar a lo

reportado por Rhody (2014) en el cual se mostraron ligeros aumentos en el volumen en el tratamiento combinado comparado con GnRHa sola pero sin cambios significativos.

Asimismo, la movilidad para todos los tratamientos de la presente tesis, fueron bajos comparados con la movilidad presentada para *C. undecimalis* por Rhody (2014), sin embargo fueron similares a los reportados por Guzmán *et. al.*, (2011) para el *Solea senegalensis*.

La concentración fue variable por lo que una muestra de espermatozoides muy concentrada, no siempre dará una alta movilidad y puede alterar la tasa de fertilización, por lo que, la evaluación de la concentración debe estar acompañada por la medición del volumen total producido (Rurangwa *et al.*, 2004), así que como se observa en los resultados obtenidos del presente ensayo donde muestras con poco volumen tenían una alta concentración de células o viceversa, como en el caso de T3 a los 14 días con poco volumen pero alta concentración o el caso de T2 con volumen mayor pero número de células bajo. Además la concentración tan alta de T3 (14 días) al parecer se vio afectada por la variabilidad individual de cada organismo y por el número pequeño de individuos, por lo que la variabilidad fue alta.

El número de células reportado en estos resultados a los 14 días en el tratamiento de T2 ($8.32 \pm 1.99 \times 10^9$) y T3 ($9.53 \pm 4.73 \times 10^9$) fue bajo en comparación con lo reportado por Rhody (2014) en donde se obtuvo concentraciones de $7.52 \pm 1.74 \times 10^{10}$ para el tratamiento con GnRHa y $9.55 \pm 3.27 \times 10^{10}$ para el tratamiento combinado a los 20 días después de la aplicación hormonal.

El aumento significativo en el número de células espermáticas en el tratamiento de T1, podría tomarse como un posible efecto del PIM sobre acción dopaminérgica, sin embargo, si hubiera tal efecto, se vería reflejado también en el volumen y en la movilidad e incluso en el tratamiento combinado, lo cual no sucedió. El efecto de la administración de inhibidores tampoco ha sido exitosa en algunos otros casos como el *Dicentrarchus labrax* (Prat *et al.*, 2001) y en

Bidyanus bidyanus (Levavi-Sivan *et al.*, 2004), sin embargo, ha sido efectivo en algunas otras especies como el *Solea senegalensis* (Guzmán *et al.*, 2011) mostrando la presencia de DA en el eje reproductivo.

En el presente estudio, no se detectó la presencia de DA mediante la utilización de PIM en las condiciones utilizadas, similar a lo obtenido por Rhody (2014), apoyando la idea falta de presencia inhibitoria de dopamina en la producción de esperma de robalo blanco. Sin embargo, puede ser que la utilización de algún otro inhibidor de la dopamina como el domperidone o metaclopramide potencie la producción de esperma ya que el estudio realizado por Cejko *et al.* (2012) muestra diferencias entre dos inhibidores de la DA en la producción de esperma de *Leuciscus leuciscus* o en *Osmerus eperlanus*, donde se han presentado diferencias con la utilización de dos antagonistas (Król *et al.*, 2009), lo que tal vez pudiera funcionar también en machos de *C. undecimalis*.

Con la idea de ausencia de DA en la producción de esperma en machos de robalo blanco, se considera entonces que la GnRHa tendría que actuar en eje reproductivo, como en el caso de especies del género *Morone* (Mylonas & Zohar, 2001) por lo que en el segundo ensayo, se evaluó el efecto de la GnRHa a periodos de tiempo cortos, para fines prácticos, puesto que al momento de realizar fertilización manual en el laboratorio, el esperma se necesita obtener lo más fresco posible para la fertilización de huevos.

En el experimento dos, se presentó un aumento de volumen con diferencias significativas en el tercer día y su inicial, sin embargo, la cantidad de esperma fue menor a 1 ml por pez, lo cual es poco para organismos de estas tallas (3.3 ± 0.1 kg), ya que si se compara con organismos capturados del medio silvestre de *C. undecimalis*, la cantidad obtenida de esperma es mucho mayor por ejemplo en organismos sacrificados de peso 5-6 kg la cantidad de esperma obtenida es de 20

a 40 ml (Sánchez Zamora A. comunicación personal) y también en el medio silvestre el esperma se puede obtener por presión abdominal y en laboratorio no. Además, en un segundo experimento realizado por Rhody (2014) en machos de robalo donde se evaluó GnRHa pero a mayor concentración (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$) que la utilizada en el presente trabajo (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$), se obtuvo un el volumen total de 220 ± 25 μl utilizando pellets de liberación lenta y 205 ± 35 μl utilizando pellets de menor liberación en organismos de peso promedio 2.0 ± 1.0 kg a los 10 días pero su volumen de decreció significativamente de los 0 a los 10 días, para ambos tratamientos; aún esta cantidad de volumen reportada, sigue alta en comparación con lo reportado en el presente ensayo, no obstante, con la poca cantidad de esperma obtenida, se fertilizaron huevos.

El problema con la baja calidad de esperma de reproductores de robalo, puede estar asociada al estrés que afecta el potencial reproductivo (Schreck, 2010). De igual manera, la alimentación es un factor importante a tomar en cuenta, puesto que afecta la gametogénesis y calidad de los gametos (Bobe & Labbé, 2010), por lo que, una dieta rica en vitaminas, minerales, lípidos y ácidos grasos podría mejorar (Flores-Quintana, 2002) los eventos reproductivos de *C. undecimalis*.

La movilidad por su parte, fue variable, obteniendo el valor más alto al tercer día ($76\pm 15\%$) similar con lo reportado por Rhody (2014) donde se obtuvieron valores $\geq 75\%$ para *C. undecimalis* mientras para *C. pararellus* se reportaron valores de 100% de movilidad en tratamientos con GnRHa (Contreras-García *et al.*, 2011).

Se observó que la concentración fue disminuyendo conforme pasaron los días de experimento teniendo que muestras de esperma con poco volumen son muy densas y contienen gran número de células y muestras con mucho volumen que no son demasiado densas, contienen bajo número de células espermáticas; como en el caso del día tres en donde una muestra con poco

volumen tenía gran número de células. Probablemente esto se deba a que la utilización de hormonas exógenas en algunos peces, ha mejorado el volumen de esperma como resultado de la hidratación de los testículos mediante la producción de fluido seminal que es afectado por esteroides y el cual facilita el flujo de espermatozoides que no son liberados y las hormonas administradas vuelven disponibles los espermatozoides pero con el tiempo disminuye la densidad significativamente (Mylonas *et al.*, 2017).

La concentración más alta obtenida por la aplicación de GnRHa, se dio al primer día con $20 \pm 7.93 \times 10^{10}$ cel/ml sin embargo comparado con lo reportado por Rhody (2014) en su segundo experimento, sigue siendo bajo, ya que su concentración fue de $9.33 \pm 1.27 \times 10^{11}$ a lenta entrega y $9.25 \pm 3.84 \times 10^{11}$ a regular entrega, además su control también mostró disminución con el paso del tiempo, lo que parece indicar que puede haber una disminución natural de la concentración de células. Por otra parte, concentraciones más similares a nuestros resultados, se presentaron para el *C. paralellus* con 1.02×10^9 a dosis de 100 $\mu\text{g/pez}$ de GnRHa y de $9.79 \times 10^8 \pm 2.43 \times 10^8$ a dosis de 200 $\mu\text{g/pez}$ (Contreras-García *et al.*, 2011) y se observa que como bien menciona Kowalski *et al.*, (2006), a pesar de presentar concentraciones similares, existen diferencias entre peces de la misma familia e inclusive existen diferencias entre machos pertenecientes a la misma generación, como sucedió con organismos del presente ensayo.

La administración de GnRHa se ha reportado efectiva en algunas especies como en *Morone saxatilis* donde incluso después de días de la aplicación, los organismos producen gran cantidad de esperma en comparación con el control y al inicio del experimento (Mylonas & Zohar, 2001), no obstante, hay ocasiones en que las dosis utilizadas no son suficientes, tal es el caso de *Pangasius bocourti* en el cual la dosis de 30 $\mu\text{g/kg}$ fue baja para el aumento en el volumen de esperma (Cacot

et al., 2003) o una sola dosis no es suficiente para inducir la maduración final de ovocitos, desove o espermiación y se necesitan hasta dos para poder lograrlo (Zohar & Mylonas, 2001).

En otros estudios se ha mostrado que la presencia de hembras maduras pueden provocar que los machos desoven, a causa de las feromonas liberadas pues provocan cambios en los machos. Tal es el caso del *Mugil cephalus* (Aizen *et al.*, 2005) o *Osmerus eperlanus* mantenidos con hembras y en el cual los resultados fueron positivos, probablemente por las feromonas liberadas por las hembras, concluyendo que la mezcla de sexos en organismos en cautiverio es un método efectivo para incrementar la producción de esperma de esa especie (Kowalski *et al.*, 2006), por lo que tratamientos hormonales sobre machos en presencia de hembras maduras, podría contribuir a la estimulación de la producción de esperma en machos de robalo blanco.

De acuerdo a las hipótesis planteadas, PIM no detectó la presencia de DA en machos de esta especie por lo que se rechaza su presencia, mientras el tratamiento con GnRHa, al parecer fue efectivo para mejorar el volumen y movilidad a las 48 hrs y la concentración a las 24 horas después de la inyección hormonal y de acuerdo a lo señalado por varios autores ((Mylonas & Zohar, 2001; Vermeirssen *et al.*, 2004), la GnRHa es la causante de la espermiación en algunos peces.

Los resultados reportados de ambos ensayos, contribuyen en cierta manera al desarrollo de tecnología de cultivo para una especie con alto valor comercial en el país. El avance en la reproducción controlada del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) al coadyuvar al conocimiento de este organismo, permite la diversificación de especies en cultivo lo que a su vez ayuda a que la industria sea de soporte para la actividad pesquera. *Centropomus undecimalis*, es una de las muchas especies que necesita un manejo adecuado para su producción pesquera, además lograr la optimización de obtención de larvas, contribuiría a la producción de esta especie a gran escala que contribuyan a la seguridad alimentaria y por otra parte, puede ser utilizada como

actividad de repoblamiento. Además, es una especie que se pasa gran parte de su vida cercana a la zona costera, por lo que se ve amenazada por la pérdida de hábitat.

La acuicultura como actividad, contribuye a la generación de alimentos pero además atribuye con oportunidades de empleo que proporcionan bienestar a comunidades, no obstante, su desarrollo tiene que estar de acorde con los niveles de calidad ambiental del sitio donde se encuentren, lo que llevaría al desarrollo de la acuicultura de manera sustentable. Para que esto sea una realidad, la actividad primero tiene que asentarse en zonas adecuadas para su desarrollo (considerando límites de soporte del ecosistemas), también debe haber participación de las comunidades en la planeación y manejo de los recursos y finalmente debe existir un marco regulatorio que norme las actividades económicas y sociales (Flores & Euán, 2004).

Actualmente existen vedas para robalo blanco y para robalo prieto pero estas son de aproximadamente un mes y sólo para dos estados costeros: del 15 de mayo al 30 de junio de barra de Soto la Marina en Tamaulipas a barra de Chachalacas en Veracruz y del 1 de julio al 15 de agosto de barra de Chachalacas a barra de Tonalá entre Veracruz y Tabasco (INAPESCA, 2013) las cuales, se consideran insuficientes ya que sólo se protege a la especie por dos meses del total de toda su temporada reproductiva (abril a septiembre en el Golfo de México), sin embargo, se está revisando la ampliación de su veda y tallas mínimas de captura.

6. Conclusiones

- En ambos ensayos, se buscó incrementar la producción de volumen de esperma junto con la movilidad y la concentración, es decir, que dichas características aumentaran de manera similar, no obstante, no se obtuvieron los valores más altos al mismo tiempo de muestreo, pues el mayor volumen y la mayor movilidad no coincidieron con el día de la mayor concentración espermática, por ende, se sugiere mejorar el método.
- Al no mostrar un efecto del PIM sobre el volumen, movilidad y concentración tanto en el tratamiento sólo como en el combinado, se concluye que no se detectó la presencia de DA en machos de *C. undecimalis* con PIM en el primer ensayo.
- Al evaluar tal hormona a períodos cortos después de su aplicación, se considera que el tiempo de muestreo más efectivo para obtención de volumen y movilidad altos fue a las 24 hrs mientras la mayor concentración de células espermáticas se obtuvo las 72 hrs.
- Este tipo de estudios son necesarios para poder hacer eficiente la actividad de los machos, lo que ayudará a producir una nueva especie a nivel comercial o para conservación, ya que primero se necesita conocer para después realizar un manejo adecuado de especies.

7. Recomendaciones

- Evaluar el volumen de esperma en organismos silvestres de varias tallas mediante biopsias gonádicas.
- Aumentar el numero de organismos por tratamiento.
- Evaluar GnRHa a más de una dosis de administración.
- Evaluar GnRHa a menores tiempos de 24 horas.
- Evaluar DOM o MET como inhibidores.
- Mezclar hembras y machos además de la administración hormonal.
- Emplear un alimento especial para reproductores ricos en omega 3 y 6.
- Intentar realizar la evaluación de las características espermáticas mediante el método de análisis de esperma asistido por computadora (CASA) para hacer más preciso las evaluaciones espermáticas.
- Evaluar la capacidad de fertilización de huevos a partir del esperma producido mediante aplicación hormonal.

8. Bibliografía

- Aizen, J., Meiri, I., Tzchori, I., Levavi-Sivan, B., & Rosenfeld, H. (2005). Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology*, 142 (1–2 SPEC. ISS.): 212–221. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.01.002>
- Alvarez-González, C. A., Gaxiola-Cortés, G., Jiménez-Martínez, L. D., Sanchez-Zamora, A., Arena-Ortiz, L., Martínez-Bruguete, T., Tovar-Ramírez D., Concha-Frías B., Márquez-Couturier G., Perales-García N., Asencio-Alcudia G. G. & Jesús-Ramírez, F. (2010). Avances en la fisiología digestiva del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en Tabasco, México. En: Cruz-Suarez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López M-G., Villareal-Cavazos, D.A., Gamboa-Delgado, J. (Eds.), Avances en Nutrición Acuícola X-Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 98-231.
- Alvarez-Lajonchère, L., & Tsuzuki, M. Y. (2008). A review of methods for *Centropomus* spp. (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. *Aquaculture Research*, 39 (7): 684–700. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01921.x>
- Aramli, M. S., Kalbassi, M. R., & Nazari, R. M. (2013). Monthly fluctuations during the breeding season of sperm density, volume, motility, and composition of seminal and coelomic fluid in broodfish of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* Borodin, 1897. *Applied Ichthyology*, 30: 261–266. <http://doi.org/10.1111/jai.12398>

- Arreguín-Sánchez, F., & Arcos-Huitrón, E. (2011). La pesca en México: estado de la explotación y uso de los ecosistemas. *Hidrobiológica*, 21 (3): 431–462.
- Barreno Coba, J. R. (2015). Crecimiento del Robalo (*Centropomus viridis*) en jaulas a diferentes densidades de siembra alimentados con dieta artificial y alimento vivo mediante tres tratamientos en la camaronera Camcomarca S.A comuna Palmar. Universidad Estatal Península de Santa Elena. Facultad de ciencias del mar. Ecuador. 88 p
- Bobé, J., & Labbé, C. (2010). Egg and sperm quality in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 165 (3): 535–548. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.02.011>
- Bouvet, Y. (2018). Recursos alimentarios y espacios marítimos : una geografía de la pesca en el mundo. *Revista de Estudios Marítimos y Sociales*, (12): 189–214.
- Caballero-Chávez, V. (2011). Reproducción y fecundidad del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en el suroeste de Campeche. *Ciencia Pesquera*, 19 (1): 35–46.
- Caballero-Chávez, V. (2012). Evaluación de la pesquería de robalo blanco *Centropomus undecimalis* en Ciudad del Carmen, Campeche. *Ciencia Pesquera*, 20 (2): 35–42.
- Caballero-Chávez, V., Lorán-Nuñez, R. M., Gómez-Ortiz, Ma. G., Garduño-Dionate, M., Martínez-Isunza, F. R., & Wakida-Kusunoki, A. T. (2014). Robalo del Golfo de México. En Beléndez M., L. F. J., Espino B., E., Galindo C., G., Gaspar-Dillanes, Ma. T., Huidobro C., L., Morales B. E. (Eds.), *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México; Evaluación y Manejo*. Primera edición. SAGARPA, Instituto Nacional de Pesca. 213–241.
- Cacot, P., Eeckhoutte, P., Muon, D. T., Trieu, N. V., Legendre, M., Mariojouis, C., & Lazard, J. (2003). Induced spermiation and milt management in *Pangasius bocourti* (Sauvage, 1880).

- Aquaculture*, 215 (1–4): 67–77. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00032-7](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00032-7)
- Cejko, B. I., Targońska, K., Kowalski, R. K., Zarski, D., Sarosiek, B., Kucharczyk, D., & Glogowski, J. (2012). The effectiveness of hormonal preparations (Ovopel, Ovaprim, LHRHa, hCG and CPE) in stimulating spermiation in dace *Leuciscus leuciscus* (L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 28 (6): 873–877. <https://doi.org/10.1111/jai.12054>
- Contreras-García, M. de J., Contreras-Sánchez, W., Hernández-Vidal, U., Arias-Rodríguez, L., McDonald-Vera, A., Vidal-lópez, J. M., Álvarez-González, C. A., Páramo D. S. & Patiño, R. (2011). Evaluación espermática del robalo chucumite (*Centropomus parallelus*) usando implantes de GnRHa bajo condiciones de laboratorio. *Kuxulkab' Revista de Divulgación*, 17 (32): 11–15. <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.1171.4643>
- Contreras-Sánchez, W. M., Contreras-García, M. de J., McDonald-Vidal, A., Hernández-Vidal, U., Cruz-Rosado, L., & Martínez-García, R. (2015). Manual para la producción de robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en cautiverio. Segunda edición. Villahermosa, Tabasco, México: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Colección José N. Rovirosa. Biodiversidad, Desarrollo Sustentable y Trópico Húmedo. 32 p.
- Dufour, S., Weltzien, F-A., Sebert, M-E., Le Belle, N., Vidal, B., Vernier, P., & Pasqualini, C. (2005). Dopaminergic Inhibition of Reproduction in Teleost Fishes. *New York Academy of Sciences*, 1040 (1): 9–21. <http://doi.org/10.1196/annals.1327.002>
- Escárcega, R., S. (2014). Perspectivas de la piscicultura marina en el pacífico sur de México. *Revista Digital Universitaria*, 15 (10): 1–14.
- FAO. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad

alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 p.

Figueras, A., & Novoa, B. (2014). Biotecnología marina y acuicultura. *Arbor*, 190 (768): a153.

<http://doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4007>

Flores Nava, A., & Euán Avila, J. (2004). La acuicultura en el marco del manejo integral de la zona costera: reflexiones generales. En Rivera Arriaga E., Villalobos G. J., Azuz Adeath. I., Rosado May. F. (Ed.), *El Manejo Costero en México*. Universidad Autónoma de Campeche, SEMARNAT, CETYS-Universidad, Universidad de Quintana Roo. 551-560

Flores-Quintana, C. (2002). Respuestas neuroendócrinas al estrés en peces teleósteos. *Rev. Ictiol.*, 10 (1-2): 57-78.

Fragoso Machado, M. R., de Olivera Souza, H., Lemos de Souza, V., de Azevedo, A., Goitein, R., & Dias Nobre, A. (2013). Morphological and anatomical characterization of the digestive tract of *Centropomus parallelus* and *Centropomus undecimalis*. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 35 (4): 467-474. <http://doi.org/10.4025/actascibiolsci.v35i4.14352>

Freire Silvão, C., & Pinto Nunes, A. J. (2017). Effect of dietary amino acid composition from proteins alternative to fishmeal on the growth of juveniles of the common snook, *Centropomus undecimalis*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 46 (7): 569-575. <http://doi.org/10.1590/S1806-92902017000700003>

Gómez-Ortiz, Ma. G., López-Navarrete, H., Arteaga-Peña, R., Balderas-Telles, J. & Acosta-Barbosa, G. (2015). Parámetros poblacionales , biológicos y pesqueros de robalo blanco *Centropomus undecimalis* del sur de Tamaulipas y norte de Veracruz , México. *Ciencia Pesquera*, 23 (2): 45-57.

- Guzmán, J. M., Cal, R., García-López, Á., Chereguini, O., Kight, K., Olmedo, M., Sarasquete, C., Mylonas, C. C., Peleteiro J. B., Zohar Y. & Mañanós, E. L. (2011). Effects of in vivo treatment with the dopamine antagonist pimozide and gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) on the reproductive axis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 158 (2): 235–245. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.11.016>
- Holland M. C. H, Hassin, S., & Zohar, Y. (2002). The effects of long-term testosterone, gonadotropin-releasing hormone agonist, and pimozide treatments on testicular development and luteinizing hormone levels in Juvenile and early maturing striped bass (*Morone saxatilis*). *General and Comparative Endocrinology*, 129: 178–187. <http://doi.org/10.1095/biolreprod59.5.1153>
- Ibarra-Castro, L., Alvarez-Lajonchère, L., Rosas, C., Palomino-Albarrán, I. G., Holt, G. J., & Sanchez-Zamora, A. (2011). GnRHa-induced spawning with natural fertilization and pilot-scale juvenile mass production of common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). *Aquaculture*, 319 (3–4): 479–483. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.07.014>
- INAPESCA. (2012). Robalo blanco (*Centropomus undecimalis*). Catálogo de tecnologías para la industria acuícola en la región de trópico húmedo. México D.F. 21 p.
- INAPESCA. (2013). *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México; Evaluación y Manejo 2013*. (L. F. J. Belédez M, E. Espino B, G. Galindo C, T. Gaspar-Dillanes, L. Huidobro C, & E. Morales B, Eds.) (primera ed). México D.F. 463 p.
- Kowalski, R. K., Hliwa, P., Andronowska, A., Król, J., Dietrich, G. J., Wojtczak, M., Stabiński, R. & Ciereszko, A. (2006). Semen biology and stimulation of milt production in the European

- smelt (*Osmerus eperlanus* L.). *Aquaculture*, 261 (2): 760–770.
<http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.038>
- Król, J., Kowalski, R. K., Hliwa, P., Dietrich, G. J., Stabiński, R., & Ciereszko, A. (2009). The effects of commercial preparations containing two different GnRH analogues and dopamine antagonists on spermiation and sperm characteristics in the European smelt *Osmerus eperlanus* (L.). *Aquaculture*, 286 (3–4): 328–331.
<http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.09.034>
- Kumakura, N., Okuzawa, K., Gen, K., & Kagawa, H. (2003). Effects of gonadotropin-releasing hormone agonist and dopamine antagonist on hypothalamus-pituitary-gonadal axis of pre-pubertal female red seabream (*Pagrus major*). *General and Comparative Endocrinology*, 131 (3): 264–273. [http://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00012-1](http://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00012-1)
- Kumar, P., Saranya, V., Natarajan, M., Kailasam, M., & Biswas, G. (2015). Ultrastructure of grey mullet (*Mugil cephalus*, Linnaeus, 1758) spermatozoa as revealed from light, scanning and transmission electron microscopy. *Journal of Applied Ichthyology*, 31(6), 1113–1119.
<https://doi.org/10.1111/jai.12902>
- Levavi-Sivan, B., Vaiman, R., Sachs, O., & Tzchori, I. (2004). Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*, 229 (1–4): 419–431. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00349-1](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00349-1)
- Lorenzen, K., Agnalt, A-L., Blankenship, H. L., Hines, A. H., Leber, K. M., Loneragan, N. R., & Taylor, M. D. (2013). Evolving Context and Maturing Science: Aquaculture-Based Enhancement and Restoration Enter the Marine Fisheries Management Toolbox. *Reviews in*

Fisheries Science, 21 (3–4): 213–221. <http://doi.org/10.1080/10641262.2013.837358>

Miranda, L. A., Chalde, T., Elisio, M., & Strüssmann, C. A. (2013). Effects of global warming on fish reproductive endocrine axis, with special emphasis in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *General and Comparative Endocrinology*, 192: 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.02.034>

Moyano López, F. J. (2013). La acuicultura como sistema de producción de alimentos. Retos y oportunidades. *Cuadernos de Estudios Agroalimentarios*. 7–21.

Muller, R. G., & Taylor, R. G. (2012). The 2012 Stock Assessment Update of Common Snook, *Centropomus undecimalis*. Fish and Wildlife Research Institute. Florida, USA. 156 p.

Muñoz-Cueto, J. A. (2005). Control hormonal de la reproducción en peces. En “Cultivo de Peces Marinos”. Silva. A. (Ed.) Universidad Católica del Norte. Coquimbo. Chile: 101–158

Muñoz Cueto, J. A., Carrillo Estévez, M., Zanuy, S., Rocha, A., Molés, G., Bayarri, Ma. J., Piferrer F., Hernández-Palacios H., Izquierdo M. S., Cerda J., Herráez Ma. P., Navas J. M., Cañávate J. P., Gracia López V., Valdebenito Isler, I. (2009). La Reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. En Espinosa de los Monteros, J. (Ed.) Publicaciones Científicas y Tecnológicas de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura. Madrid, España: Fundación Observatorio Español de Acuicultura, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 718 p

Mylonas, C. C., Duncan, N. J., & Asturiano, J. F. (2017). Hormonal manipulations for the enhancement of sperm production in cultured fish and evaluation of sperm quality. *Aquaculture*, 472: 21–44. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.021>

- Mylonas, C. C., Fostier, A., & Zanuy, S. (2010). Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 165 (3): 516–534. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.03.007>
- Mylonas, C. C., & Zohar, Y. (2001). Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. *Aquaculture*, 202 (3–4): 205–220. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00772-4](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00772-4)
- Pankhurst, N. W. (1994). Effects of gonadotropin releasing hormone analogue , human chorionic gonadotropin and gonadal steroids on milt volume in the New Zealand snapper, *Pagrus auratus* (Sparidae). *Aquaculture*, 125: 185–197.
- Perera-García, M.A, Mendoza-Carranza, M., Contreras-Sánchez, W.M., Huerta-Ortíz, M., & Pérez-Sánchez, E. (2011). Reproductive biology of common snook *Centropomus undecimalis* (Perciformes: Centropomidae) in two tropical habitats. *Revista de Biología Tropical*, 59 (2): 669–681. <http://doi.org/10.15517/rbt.v0i0.3131>
- Perera-García, M. A., Mendoza-Carranza, M., & Páramo-Delgadillo, S. (2008). Dinámica reproductiva y poblacional del robalo, *Centropomus undecimalis* (Perciformes: Centropomidae), en Barra San Pedro, Centla, México. *Universidad y Ciencia. Trópico húmedo*. 24 (1): 49–60.
- Podhorec, P., Socha, M., Sokolowska-Mikolajczyk, M., Policar, T., Svinger, V. W., Drozd, B., & Kouril, J. (2012). Dopamine control of LH release in the tench (*Tinca tinca*). *General and Comparative Endocrinology*, 175 (1): 34–38. <http://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.10.013>
- Polonía R, C., Gaitán I, S., Ruíz V, J., Villamizar V, N., & Chaparro M, N. (2016). Evaluación

- económica del cultivo de róbalo (*Centropomus undecimalis* B.) en estanque de agua dulce. *Agronomía Colombiana*, 34: 44–47. <http://doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n1supl.58212>
- Prat, F., Zanuy, S., & Carrillo, M. (2001). Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) and pimozide on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 198 (3–4): 325–338. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00600-1](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00600-1)
- Reyes Canino, R., Fernández Rodríguez, N., Rodríguez Guerra, W., de la Paz del Valle, L., Hamamitsu, Y., & Futaguawa, M. (2015). Avances en la producción de juveniles del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*, Bloch 1792). Desove inducido. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras*, 32 (1): 11–16.
- Reyes, R., Ramos, D., Fraga, I., Galindo, J., & Ortega, N. (2004). Creación de un banco de progenitores de Róbalo *Centropomus undecimalis*, Bloch. Evaluación de alimentos artificiales. *Comunicación Científica*. 814–820.
- Rhody, N. R. (2014). Optimisation of common snook *Centropomus undecimalis* broodstock management. University of Stirling. Institute of Aquaculture. Scotland. 268 p
- Rhody, N. R., Neidig, C. L., Grier, H. J., Main, K. L., & Migaud, H. (2013). Assessing reproductive condition in captive and wild common snook stocks: A comparison between the wet mount technique and histological preparations. *Transactions of the American Fisheries Society*, 142 (4): 979–988. <http://doi.org/10.1080/00028487.2013.788564>
- Rosales Inzunza, S., & Acevedo Valerio, V. A. (2011). La política acuícola: ¿Instrumento para el desarrollo regional? *Investigación y Ciencia*, (52): 53–62.

- Rurangwa, E., Kime, D. E., Ollevier, F., & Nash, J. P. (2004). The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*, 234 (1–4): 1–28. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.006>
- Schreck, C. B. (2010). Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, 165 (3): 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.07.004>
- Sorbera, L. A., Mylonas, C. C., Zanuy, S., Carrillo, M., & Zohar, Y. (1996). Sustained Administration of GnRHa Increases Milt Volume Without Altering Sperm Counts in the Sea Bass. *The Journal of Experimental Zoology*, 276: 361–368.
- Tiersch, T. R., Wayman, W. R., Skapura, D. P., Neidig, C. L., & Grier, H. J. (2004). Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Aquaculture Research*, 35 (3): 278–288. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01013.x>
- Vergara-Chen, C. (2014). Los robalos (Pisces, Centropomidae) del Pacífico de Panamá: desafíos emergentes en investigación y conservación. *Tecnociencia*, 16 (1): 15–40.
- Vermeirssen, E. L. M., Mazorra De Quero, C., Shields, R. J., Norberg, B., Kime, D. E., & Scott, A. P. (2004). Fertility and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in relation to dose and timing of gonadotrophin-releasing hormone agonist implant. *Aquaculture*, 230 (1–4): 547–567. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00414-9](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00414-9)
- Vidal, B., Pasqualini, C., Le Belle, N., Holland, M. C. H., Sbaihi, M., Vernier, P., Zohar Y. & Dufour, S. (2004). Dopamine Inhibits Luteinizing Hormone Synthesis and Release in the Juvenile European Eel: A Neuroendocrine Lock for the Onset of Puberty. *Biology of Reproduction*, 71 (5): 1491–1500. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.104.030627>

- Yanes-Roca, C. (2006). Husbandry and larval rearing of common snook (*Centropomus undecimalis*). University of Stirling. Institute of Aquaculture. Scotland. 271 p
- Zarza-Zarza, E.A, Berruecos-Villalobos, J. M., Vásquez-Peláez, C., & Álvarez-Torres, P. (2006). Cultivo experimental de robalo *Centropomus undecimalis* y chucumite *Centropomus parallelus* (Perciformes : Centropomidae) en estanques rústicos de tierra. *Ciencias Marinas*, 32 (2): 219–227.
- Zohar, Y. & Mylonas, C. C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197 (1–4): 99–136. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00584-1](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00584-1)