

00344  
5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INDUCCIÓN A LA MADURACIÓN Y DESOVE DEL ROBALO  
BLANCO *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792)  
(PISCES:CENTROPOMIDAE) MEDIANTE LA APLICACIÓN DE  
GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA Y UNA ANÁLOGA  
DE LA HORMONA LIBERADORA DE LA HORMONA  
LUTEINIZANTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

(BIOLOGÍA DE SISTEMAS Y RECURSOS ACUÁTICOS)

P R E S E N T A :

OCEAN. LUIS MANUEL GÓMEZ DÍAZ DURÁN

DIRECTORES DE TESIS: M. en C. ADOLFO SÁNCHEZ ZAMORA

M. en C. MARTHA RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ

MÉXICO, D.F.

2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

## AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Adolfo Sánchez Zamora por darme la oportunidad de iniciar juntos la experiencia del cultivo de peces marinos. Mi más sincera gratitud.

A la M. en C. Martha Rodríguez Gutiérrez por sus valiosas sugerencias que permitieron enriquecer el presente trabajo.

A la Dra. Gabriela Gaxiola por aportar sus conocimientos para el buen desarrollo de la presente, así como por brindarme su amistad.

Al M. en C. Salomón Páramo Delgadillo por sus comentarios y críticas positivas para el mejor desarrollo de este trabajo.

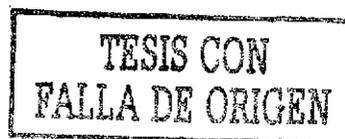
A la Dra. María del Carmen Uribe por aportar su experiencia al presente trabajo y por transmitir esa calidez humana que la caracteriza.

Al Dr. José Luis Arredondo y Dr. Carlos Martínez por sus comentarios y atinadas sugerencias, siempre bienvenidas.

Al Dr. Carlos Rosas Vázquez, quién ha sabido conformar un gran equipo de trabajo. Mi agradecimiento por darme la oportunidad de haber pertenecido a ese barco...que pronto zarpará de nuevo.

A la Dra. Ma. del Pilar Torres por brindarme su confianza para la utilización del Laboratorio de Histología, Gracias.

A la Bióloga Tere Sosa por su paciencia, tiempo y dedicación para enseñarme las técnicas histológicas. Gracias Tere.



A la Dra. Tsai García Galano por su decidida participación en el desarrollo de los ensayos y por aportar su amplia experiencia al mismo.

Al Ing. en Acuicultura Jaime Suárez Bautista, por su valiosa y entusiasta participación en el desarrollo del proyecto.

A Gabriel, Adrianita, Gabriela, Cristina, Pedro, Rolando, Brito, Miti, Manuel, Claudia, Ariadna, Maru, Maite, Nuno, Nelda, Gema, Kike, Tomás, Marcos; integrantes todos ellos del grupo del Laboratorio de Biología Marina Experimental, por su gran compañerismo, apoyo y ánimos que hicieron más agradable mi estancia en la “Isla del Deseo”.

A la Secretaría de Educación Pública, quién a través del programa PROMEP me dio la oportunidad de llevar a cabo estos estudios mediante el disfrute de una beca.

Al Subsistema de Investigación SISIERRA (CONACyT) quién otorgó el apoyo económico, a través del Colegio de la Frontera Sur, para la realización del proyecto “Cultivo de Robalo”.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## TABLA DE CONTENIDO

|   |           |
|---|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS.....  | iii       |
| ÍNDICE DE TABLAS.....   | iv        |
| RESUMEN.....  | v         |
| ABSTRACT.....   | vi        |
| <b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>II. OBJETIVOS GENERALES.....</b>   | <b>5</b>  |
| II.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 5         |
| <b>III. ANTECEDENTES.....</b>   | <b>6</b>  |
| III.1. ENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN TELEÓSTEOS.....   | 10        |
| III.2. FUNCIONES DEL HIPOTÁLAMO Y PITUITARIA.....   | 10        |
| III.3. GAMETOGENESIS.....   | 14        |
| III.3.1. <i>Espermatogénesis</i> .....  | 15        |
| III.3.2. <i>Ovogénesis</i> .....  | 15        |
| III.3.2.1. Crecimiento vitelogénico.....  | 16        |
| III.3.2.2. Maduración del ovocito.....  | 16        |
| III.3.2.3. Ovulación.....   | 17        |
| III.3.3. <i>Inducción hormonal</i> .....  | 17        |
| <b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>  | <b>20</b> |
| IV.1. CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS DIFERENTES ESTADIOS GONADALES DE<br>HEMBRAS DE ROBALO BLANCO.....  | 20        |
| IV.1.1. <i>Colecta de las gónadas</i> .....   | 20        |
| IV.1.2. <i>Preparaciones histológicas en fresco</i> .....   | 21        |
| IV.1.3. <i>Preparaciones histológicas permanentes</i> .....   | 22        |
| IV.2. EFECTO DE LA APLICACIÓN DE LAS HORMONAS LHRHa Y GCH EN EL<br>COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DEL ROBALO BLANCO.....   | 22        |
| IV.2.1. <i>Captura y mantenimiento de reproductores</i> .....   | 23        |
| IV.2.2. <i>Hormonas utilizadas y elaboración de los pellets</i> .....   | 25        |
| IV.2.3. <i>Aplicación de las hormonas y manipulación de los organismos</i> .....  | 25        |
| IV.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....  | 27        |
| IV.3.1. <i>Efecto crónico de la hormona LHRHa en el comportamiento reproductivo del<br/>        robalo blanco mediante la aplicación de implantes</i> .....                           | 27        |
| IV.3.1.1. Primer ensayo.....  | 28        |
| IV.3.1.2. Segundo ensayo.....   | 29        |
| IV.3.2. <i>Efecto agudo de las hormonas LHRHa y gonadotropina coriónica humana en<br/>        la inducción al desove del robalo blanco mediante inyecciones intramusculares</i> ..... | 29        |
| IV.3.2.1. Tercer ensayo.....  | 29        |



|  |           |
|--|-----------|
| <b>V. RESULTADOS.....</b>  | <b>31</b> |
| V.1. CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA DE LOS DIFERENTES ESTADIOS GONADALES DE HEMBRAS DE ROBALO BLANCO. ....  | 31        |
| V.2. TEMPORADA DE REPRODUCCIÓN DEL ROBALO BLANCO.....  | 38        |
| V.3. EFECTO CRÓNICO DE LA HORMONA LHRHA EN EL COMPORTAMIENTO REPRODUCTIVO DEL ROBALO BLANCO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE IMPLANTES. ....                            | 41        |
| V.3.1. <i>Parámetros físico-químicos</i> .....   | 41        |
| V.3.2. <i>Primer ensayo</i> .....  | 43        |
| V.3.3. <i>Segundo ensayo</i> .....   | 45        |
| V.4. EFECTO AGUDO DE LAS HORMONAS LHRHA Y GONADOTROPINA CORIÓNICAS HUMANAS EN LA INDUCCIÓN AL DESOVE DEL ROBALO BLANCO MEDIANTE INYECCIONES INTRAMUSCULARES..... | 48        |
| V.4.1. <i>Tercer ensayo</i> .....  | 48        |
| <b>VI. DISCUSIÓN .....</b>   | <b>51</b> |
| <b>VII. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>66</b> |
| <b>VIII. LITERATURA CITADA .....</b>   | <b>67</b> |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Fig. 1. Arte de pesca utilizado para la captura de robalo blanco en Laguna de Términos, Campeche.....  | 24 |
| Fig. 2. Preparación de los pellets usando peletizadora y molde de acrílico.....  | 24 |
| Fig. 3. Aplicación de una inyección de GCH en una hembra de robalo blanco.....   | 26 |
| Fig. 4. Biopsia ovárica mediante canulación de una hembra de robalo blanco. ....   | 26 |
| Fig. 5. Microfotografías de preparaciones histológicas permanentes de los estadios de perinucleolo (a) y alveolo cortical (b) de <i>C. undecimalis</i> . ....  | 33 |
| Fig. 6. Microfotografías de preparaciones histológicas del estadio de vitelogénesis en sus fases primaria (a), secundaria (b) y terciaria (c) de gónadas de <i>C. undecimalis</i> . En (d) se muestra un acercamiento a la periferia del folículo. En (b) y (c), se pueden observar folículos postovulatorios (fp), indicando un desove previo. ....   | 33 |
| Fig. 7. Microfotografías de preparaciones histológicas permanentes de ovocitos de robalo en diferentes fases del estadio de maduración final. En (a) y (b) se presentan dos momentos del inicio de la fusión de las gotas lipídicas y la transformación (proteólisis) de los globulos vitelinos; núcleo en posición central. En (c) se observa el inicio de la migración del núcleo, mientras que en (d) éste se presenta cercano a la periferia. .... | 34 |
| Fig. 8. Microfotografía a partir de una preparación histológica permanente de un ovocito de <i>C. undecimalis</i> en estadio de hidratación. ....  | 34 |
| Fig. 9. Microfotografías a partir de preparaciones histológicas en fresco de ovocitos de <i>C. undecimalis</i> en fase de crecimiento primario. En (a) todos los ovocitos están en estadio de perinucleolo, mientras que en (b) se presentan algunos en fase de alveolo cortical. ....   | 35 |
| Fig. 10. Microfotografías de preparaciones histológicas en fresco de ovocitos de <i>C. undecimalis</i> en fase de vitelogénesis. ....  | 36 |
| Fig. 11. Microfotografías de preparaciones histológicas en fresco de ovocitos de <i>C. undecimalis</i> en fases temprana (a) y tardía (b) de la maduración final; se observa el núcleo (n) cerca de la periferia y en el centro la gota lipídica (l).....  | 36 |
| Fig. 12. Microfotografía de una preparación histológica en fresco de ovocitos de <i>C. undecimalis</i> en fase temprana de hidratación.....  | 37 |
| Fig. 13 Microfotografía de una preparación histológica en fresco de ovocitos de <i>C. undecimalis</i> en fase final de hidratación (ovulación).. ....  | 37 |
| Fig. 14. Variación estacional en el índice gonadosomático en hembras y diámetros máximos promedio de ovocitos de robalo <i>C. undecimalis</i> durante el ciclo anual de julio de 1998 a junio de 1999. Media $\pm$ error estándar.....   | 39 |

|  |    |
|--|----|
| Fig. 15 (a-f). Diagramas de frecuencia del diámetro de ovocitos determinados en preparaciones histológicas en fresco. Se muestran los resultados de seis gónadas representativas. ....                           | 40 |
| Fig. 16. Valores promedio mensuales de temperatura durante los ensayos.....  | 42 |
| Fig. 17. Valores promedio mensuales de salinidad durante los ensayos. ....   | 42 |
| Fig. 18. Microfotografía de una gónada de robalo blanco sacrificado al termino del primer ensayo. Ovocitos en estadios perinuclear y de alveolo cortical.. ....  | 43 |
| Fig. 19. Peso promedio de los organismos de <i>C. undecimalis</i> durante el primer ensayo con implantes im de LHRHa a concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g}$ . Media $\pm$ error estándar. ....              | 45 |
| Fig. 20. Peso promedio de los organismos de <i>C. undecimalis</i> durante el segundo ensayo con implantes IM de LHRHa a concentraciones de 200 y 300 $\mu\text{g}$ . Media $\pm$ error estándar. ....            | 46 |
| Fig. 21. Microfotografía de una muestra de ovocitos obtenidos a partir de una biopsia ovárica al momento del implante con pellet conteniendo 300 $\mu\text{g}$ /pellet/mes de LHRHa. Ovocitos vitelogénicos..... | 47 |
| Fig. 22. Variaciones individuales mensuales en el peso de hembras que alcanzaron el estadio de vitelogénesis. Tres hembras en el tratamiento de GCH y una en el de LHRHa.. ....                                  | 50 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla I. Diseño experimental de los ensayos. ....   | 23 |
| Tabla II. Caracterización de los estadios de madurez gonádica de hembras de <i>C. undecimalis</i> en preparaciones histológicas permanentes y en fresco.....                            | 32 |
| Tabla III. Peso y longitud promedio inicial y final de los organismos experimentales durante el primer ensayo (media $\pm$ error estándar). ....  | 44 |
| Tabla IV. Peso y longitud promedio inicial y final de los organismos experimentales en el segundo ensayo (media $\pm$ error estándar).....  | 45 |
| Tabla V. Peso y longitud promedio inicial y final de los organismos experimentales durante el tercer ensayo (media).....  | 48 |
| Tabla VI. Longitud furcal, diámetro máximo de los ovocitos durante los meses de junio, julio y agosto y tiempo a la ovulación de hembras vitelogénicas inyectadas con GCH y LHRHa... .. | 50 |



## RESUMEN

El robalo blanco, *Centropomus undecimalis*, es una especie hermafrodita protándrica, eurihalina, muy apreciada para el consumo humano y con alto potencial en la acuicultura; su distribución en México comprende las costas del Golfo de México y parte del Mar Caribe e incursiona hacia aguas interiores a distancias de hasta 150 Km. Uno de los “cuellos de botella” para su cultivo es lograr la maduración y reproducción en condiciones controladas. Tradicionalmente, la producción de crías de robalo blanco ha sido mediante la captura de animales silvestres maduros y su posterior inyección con gonadotropina coriónica humana (GCH). Sin embargo, no ha sido posible inducir la vitelogénesis en condiciones de cautiverio para después utilizar hormonas sintéticas. Un aspecto importante para el uso de hormonas sintéticas es la identificación, en preparaciones en fresco, de la etapa de desarrollo de los ovocitos para un mejor efecto de las hormonas aplicadas. Por esto el presente trabajo se planteó con los siguientes objetivos: a) establecer y validar criterios de identificación para los diferentes estadios de madurez gonádica de hembras de robalo blanco mediante preparaciones histológicas en fresco y permanentes; b) evaluar el efecto de la aplicación de GCH y de una hormona análoga de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRHa) en el comportamiento reproductivo de *C. undecimalis*.

En relación con las observaciones al microscopio, se identificaron y correlacionaron siete estadios de la ovogénesis: previtelogénico (2), vitelogénico (3), maduración final y ovulación. En preparaciones permanentes, las diferentes fases vitelogénicas se caracterizan por la aparición progresiva de las vesículas de lípido y proteínicas, un aumento paulatino del folículo y vesícula germinal en posición central. La maduración final se caracteriza por la fusión de las gotas lipídicas cerca del núcleo y éste en posición intermedia entre la periferia y el centro del folículo. Los huevos ovulados (hidratados) son amorfos y se tiñen completamente de color rojo pálido con espacios citoplasmáticos vacíos. De la caracterización anterior y su posterior correlación con las preparaciones en fresco se sugieren los siguientes criterios de identificación para preparaciones en fresco: a) estadio vitelogénico: ovocitos opacos, apariencia granulosa y vesícula germinal en posición central, con diámetros de 150-474  $\mu\text{m}$ ; b) maduración final: vesícula germinal en posición intermedia entre la periferia y el centro del ovocito, éste último con diámetros de 500 a 550  $\mu\text{m}$  y c) ovulación: citoplasma claro, la presencia de una sola gota lipídica y diámetros de 700 a 800  $\mu\text{m}$ . Los criterios anteriores fueron validados durante los muestreos de los ensayos hormonales. Se aplicaron implantes que contenían LHRHa durante las temporadas no reproductiva y reproductiva: en ninguna etapa fue efectiva para inducir la vitelogénesis ni la maduración final; sin embargo, la aplicación intramuscular de 500 UI/Kg de GCH en hembras con ovocitos de 350 a 450  $\mu\text{m}$  de diámetro favoreció la vitelogénesis, maduración final y desove. Huevos ovulados fueron detectados de 36 a 41 h después de la inyección. Se logró el desove de 5 hembras y la fertilización de tres de éstas. Los resultados sugieren que hembras de robalo blanco alcanzan la vitelogénesis en cautiverio sin el uso de químicos exógenos. A partir del estadio de vitelogénesis secundaria *C. undecimalis* es sensible a la aplicación de GCH, por lo que puede ser inducido al desove. No obstante, para el logro de esta condición se requiere de un período relativamente largo (6 a 12 meses) de aclimatación a las condiciones de cautiverio, un protocolo de manejo que evite al máximo el estrés y una alimentación rica en ácidos grasos.

## ABSTRACT

The common snook, *Centropomus undecimalis*, is a protandrous hermaphroditic, euryhaline species, very appreciated for human consumption and with high potential in acuaculture. In Mexico, ranges along Gulf of Mexico and part of the Caribbean Sea, it also penetrates towards inner waters to distances of up to 150 Km. One of common snook culture "bottle-necks" is to accomplish maturity and reproduction under controlled conditions. Traditionally, the production of common snook fry has been through the capture of mature wild specimens and its later injection with human chorionic gonadotropin (HCG). However, in captive conditions it has not been possible to induce vitellogenesis and later to use synthetic hormones. An important aspect for the synthetic hormone use is the identification, in wet preparations, of the stage of development of the oocytes for a better effect of applied hormones. Therefore, the present work considered the following objectives: a) to establish and validate criteria of identification for the different stages from gametogenesis of female common snook through of wet and permanent histological preparations; b) to evaluate the effect of the application of HCG and luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LHRHa) in the reproductive behavior of *C. undecimalis*.

In relation to microscopic observations, seven oogenesis stages were identified and correlated: previtellogenic (2), vitellogenic (3), final maturation and ovulation. In permanent histological preparations, the different vitellogenic phases are characterized for the progressive appearance of protein and lipid yolk and a gradual increase of the follicle and germinal vesicle in central position. The final maturation is characterized for the fusion of lipidic droplets near the nucleus and an intermediate position in between the periphery and the center of the follicle. The ovulated eggs (hydrated) are amorphous and are dyed completely of pale red with empty cytoplasmic spaces. Of the previous characterization and their later correlation with the wet preparations, the following criteria of identification for wet preparations are suggested: a) Vitellogenic stage: opaque oocytes, granular in appearance and germinal vesicle on a central position with diameters of 150-474  $\mu\text{m}$ ; b) Final maturation: germinal vesicle on a intermediate position between the periphery and the center of the oocyte, this latter one with a diameter of 500 to 550  $\mu\text{m}$ ; c) Ovulation: clear cytoplasm, the presence of one lipidic droplet and diameters of 700 to 800  $\mu\text{m}$ . The previous criteria were validated during hormonal trials. Implants with LHRHa were applied during reproductive and non reproductive periods: The effectiveness to induce vitellogenesis or final maturation to common snook was unsuccessful in either period. However, the intramuscular application of 500 IU/Kg of HCG in females with oocytes of 350 to 450  $\mu\text{m}$  in diameter was effective in advance vitellogenesis, final maturation and ovulation. Ovulated eggs were detected to 36-41 h after injection. Ovulation was accomplished in five females and the fertilization of three of them was obtained. These results suggest that female common snook reaches vitellogenesis in captive conditions without the use of exogenous chemicals. From secondary vitellogenic phase, the common snook is sensitivity to HCG injection, reason why it can be spawn induce. Nevertheless, a relatively long (6 to 12 mos.) period to captive condition, a stress reduction handling protocol and a rich fatty acid feeding is required to the profit of this condition.

## I. INTRODUCCIÓN

Una práctica común para el desarrollo de la tecnología del cultivo de organismos acuáticos es la dependencia de larvas o juveniles del medio natural para investigación básica, ensayos piloto o a escala experimental, e incluso a nivel comercial; de hecho, así surgió la acuicultura. Sin embargo, ha traído consecuencias negativas tanto para las poblaciones naturales -ya que afecta el reclutamiento de las mismas-, como para la investigación y el cultivo en sí, debido a la variabilidad e incertidumbre en el aprovisionamiento de crías, entre otros factores. Una de las alternativas viables para evitar dicha práctica y al mismo tiempo atenuar sus consecuencias negativas es la reproducción natural o inducida de las especies bajo condiciones de cautiverio.

En ciertos organismos es posible llevar a cabo la reproducción natural en condiciones de cautiverio, sin embargo, en muchas de las especies cultivadas o con potencial en acuicultura se requiere de la aplicación de compuestos naturales o artificiales con el objeto de manipular las rutas endócrinas relacionadas con las funciones reproductivas. Generalmente, las especies que lo requieren son aquellas cuyos mecanismos fisiológicos, relacionados con la función reproductora, se ven alterados por el estrés asociado a la captura y/o condiciones de cautiverio (Crim y Glebe, 1990; Pankhurst y Van der Kraak, 1997). Tal es el caso del robalo blanco *C. undecimalis* (Wallace *et al.*, 1993) donde, a pesar de diversos intentos, no se ha logrado la maduración y desove bajo condiciones de cautiverio.

Entre los compuestos utilizados para la manipulación de las rutas endócrinas, asociadas a la reproducción de muchos teleósteos están los extractos de pituitaria homo y heteroplásticos, la gonadotropina coriónica humana (GCH), la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH ó GnRH) y sus análogos (LHRHa ó GnRHa), ciertos esteroides y algunas sustancias que bloquean la acción de la dopamina (Fontaine, 1976; Peter *et al.*, 1988), entre otros. Su utilización en acuicultura ha sido de forma individual o en combinación con otros químicos (Lee *et al.*, 1986b; García, 1990).

Fisiológicamente estos compuestos influyen a diferentes niveles del eje cerebro-hipotálamo-pituitaria-gónada, promoviendo ó inhibiendo el mecanismo secuencial que regula el proceso de reproducción natural en los teleósteos (Rottmann *et al.*, 1991a; Redding y Patiño, 1993). De

forma general el mecanismo es el siguiente: en el hipotálamo se sintetiza la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH o LHRH), la cual es estimulada para su liberación por la norepinefrina e inhibida por la dopamina. La GnRH es secretada, en respuesta a diversas señales ambientales, hacia la periferia de las células gonadotrópicas localizadas en la glándula pituitaria, induciendo a su vez la liberación de las gonadotropinas FSH (GtH I) ó LH (GtH II). Las gonadotropinas actúan al nivel de gónada y son las que en última instancia regulan el desarrollo de la madurez gonádica: así, por ejemplo, en los salmónidos, la gonadotropina FSH actúa durante la vitelogénesis y la LH en la maduración final de los ovocitos (Susuki *et al.*, 1988).

Debido a lo anterior, la identificación precisa de estas dos fases dentro del ciclo reproductivo de una especie en particular es de gran importancia para propósitos de manipulación de la actividad reproductiva en cautiverio. La vitelogénesis se caracteriza morfológicamente por un incremento en el tamaño de los ovocitos, provocado por la acumulación de vitelo producido a partir de vitelogenina (una proteína de origen hepático), vesícula germinal en posición central y citoplasma opaco; mientras que la maduración final se caracteriza por la migración de la vesícula germinal (núcleo) hacia el polo germinal, la fusión, por separado, de vitelo proteínico y lipídico, lo cual produce aclaración del citoplasma, y la subsecuente hidratación (generalmente en especies marinas) y ovulación de los ovocitos (Wallace y Selman, 1981).

En cuanto a la aplicación de los químicos mencionados anteriormente, Patiño (1997) menciona algunas ventajas y desventajas, resaltando los problemas que presentan las técnicas que utilizan los extractos de pituitaria (poco confiables debido a que su efectividad depende del grado de madurez del pez donante) y la aplicación de GCH (puede causar inmunoreacciones), en contraste con los beneficios que presentan los análogos de la LHRH (GnRH<sub>a</sub>) los cuales no provocan reacciones inmunes y, además, presentan una efectividad más amplia respecto al espectro de especies y una mayor potencia, en cuanto a su efecto, con respecto a las anteriores.

En el caso particular del robalo blanco, *C. undecimalis*, se han realizado ensayos de inducción a la maduración con LHRH<sub>a</sub> + 17 $\alpha$ -metiltestosterona (Herdenson-Arzapalo *et al.*, 1988b);

inducción a la ovulación en organismos maduros provenientes del medio natural mediante inyecciones de GCH (Ager *et al.*, 1976; Chapman, 1976; Neidig *et al.*, 2000a y b) e implantes con varias análogas de la GnRH (Skapura *et al.*, 2000) y utilización, *in vitro*, de extractos homoplásticos de pituitaria y GCH (Wallace *et al.*, 1993).

El éxito en la inducción al desove dependerá, en primera instancia, del grado de madurez de las gónadas. En el caso de hembras de robalo, Wallace *et al.* (1993) reportan una reducción gradual de los valores del índice gonadosomático, causada por el estrés post captura, durante un período de ocho días en que se mantuvieron en cautiverio. Estos autores concluyen que dicha degeneración en los ovarios limita a solo cuatro días de cautiverio el uso de hembras maduras recién capturadas del medio natural para propósitos reproductivos. En el caso de los machos, no se ha observado que ocurran alteraciones en la condición de madurez en organismos en cautiverio (Tucker, 1987). A pesar de lo anterior, la obtención artificial de larvas de robalo blanco mediante la ovulación inducida con GCH, a partir de hembras maduras recién capturadas del medio, es práctica común desde hace algunos años en la región de la Florida, E. U. (Ager *et al.*, 1976; Chapman, 1976), aunque con resultados variables en cuanto a viabilidad de huevos y larvas. A este respecto, Wallace *et al.* (1993) hacen hincapié en que poco se conoce acerca de la biología reproductiva del robalo, en particular sobre aspectos básicos de la fisiología del ovario.

La carencia de un conocimiento detallado de la biología reproductiva y la fisiología de los teleósteos es causa importante para las fallas en su propagación en cautiverio y, si bien es cierto que los mecanismos de crecimiento de los ovocitos son similares para la mayoría de ellos (Wallace y Selman, 1981), ciertos aspectos de la fisiología reproductiva de los mismos muestran marcadas diferencias entre las especies, por lo que las técnicas de propagación para los peces más estudiados como salmónidos y ciprínidos, no siempre son aplicables a otras especies. Además, la existencia de variantes en los patrones reproductivos con relación a la zona geográfica (Rodríguez, 1992a; Tringali y Bert, 1996), así como la diversidad de técnicas y hormonas empleadas para la inducción al desove y el nivel en el eje endocrinológico en el que actúan, hacen necesario llevar a cabo una evaluación correcta de la madurez gonádica de

los potenciales reproductores para seleccionar el momento, tipo y dosis de hormona a emplear (Rodríguez, 1992b).

En México, el cultivo de robalo es incipiente (Muhlia-Melo, 1995); algunas estrategias que se han implementado como el cultivo experimental en estanques de concreto en Ciudad del Carmen, Campeche (Amador del Ángel *et al* , 1994) y policultivo en encierros en la Laguna de Meacoacán, Tabasco, se han abastecido de juveniles del medio natural. Esto último y el hecho de que esta especie esté sometida a una intensa presión de pesca por parte de los pescadores ribereños en la costa del Golfo de México, pueden provocar efectos negativos considerables en las poblaciones naturales, como ha sucedido en otras pesquerías como la del camarón en la costa del Pacífico.

Por lo anterior, y debido a que en nuestro país no se tienen antecedentes documentados de desoves inducidos de *C undecimalis*, en este trabajo se pretende establecer las condiciones mínimas para la maduración y la inducción al desove en condiciones de cautiverio de esta especie, mediante la adecuación de procedimientos practicados hasta la fecha como la evaluación de tratamientos hormonales que han probado dar resultados positivos en otras especies.

## II. OBJETIVOS GENERALES

Establecer criterios confiables para la identificación de los diferentes estadios de madurez gonádica de hembras de *C. undecimalis*, en preparaciones histológicas en fresco.

Evaluar el efecto de la aplicación de gonadotropina coriónica humana (GCH) y de una análoga de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRHa) en el comportamiento reproductivo de *C. undecimalis*.

### II.1. Objetivos específicos

Caracterizar los diferentes estadios de madurez gonádica de hembras de *C. undecimalis* a través de preparaciones histológicas permanentes y en fresco, utilizando organismos provenientes de capturas comerciales.

Elaborar un cuadro comparativo de las características de los ovocitos en preparaciones histológicas en fresco *versus* permanentes.

Evaluar el efecto mensual de implantes intramusculares de LHRHa en el desarrollo gonadal de organismos sexualmente inmaduros de *C. undecimalis* en las temporadas reproductiva y no reproductiva.

Evaluar el efecto de la aplicación de inyecciones intramusculares de LHRHa y GCH en la inducción a la maduración final de hembras vitelogénicas de *C. undecimalis* aclimatadas a condiciones de cautiverio.

### III. ANTECEDENTES

Rivas (1986) hace una revisión sobre la sistemática de *Centropomus* con el objeto de clarificar y estabilizar la taxonomía y nomenclatura de las especies pertenecientes a este género. Concluye que solo doce especies, de un total de 30 descritas hasta esa fecha, pueden aceptarse como válidas basándose en sus caracteres merísticos y morfométricos; además, lo subdivide en tres "grupos de especies", designándolos como "grupo *C. Pectinatus*", "grupo *C. undecimalis*" y "grupo *C. ensiferus*", de acuerdo con un análisis de matriz utilizando 47 caracteres taxonómicos. Estas conclusiones basadas en caracteres anatómicos fueron, además, sustentadas posteriormente por estudios de biología molecular (electroforesis aloenzimática y secuenciación del gen 16S rRNA) llevados a cabo por Tringali *et al.* (1999a) y Tringali *et al.* (1999b).

El robalo blanco *Centropomus undecimalis* pertenece al orden Perciformes; familia Centropomidae; subfamilia Centropominae y género *Centropomus*. Las doce especies de este género forman un grupo compacto y homogéneo; la forma del cuerpo y de las aletas son muy similares así como su coloración plateada uniforme y la presencia de una línea lateral oscura muy marcada que penetra hasta la aleta caudal (Rivas, 1986). La distribución geográfica del género está restringida a ambas costas del continente americano, sin embargo, no se conoce que una especie ocurra simultáneamente en los océanos Atlántico ó Pacífico (Rivas, 1986). Este grupo es muy diferente de los géneros *Lates* y *Psammoperca*, miembros de la subfamilia Latinae, que junto con la subfamilia Centropominae conforman la familia Centropomidae.

*C. undecimalis* presenta el cuerpo alargado y moderadamente comprimido, la primera aleta dorsal tiene ocho espinas, siendo la primera muy pequeña mientras que la segunda aleta dorsal presenta solo una espina y diez radios. La boca es grande y poco protráctil y de forma ligeramente oblicua; mandíbulas desiguales, sobresaliendo la inferior; la cabeza es grande y ligeramente deprimida (Chávez, 1961). La longitud y peso máximo registrados por la Asociación Internacional de Pesca Deportiva son de 130 centímetros y 27 kilos, respectivamente (IGFA, 1996; citado en Tringali y Leber, 1999).

El robalo blanco *C. undecimalis* es una de las once especies del género *Centropomus* que habita en las costas de México. Es una especie eurihalina y estenotérmica cuyo rango de distribución es el más amplio dentro del género y está delimitada por la isoterma de 15°C (Marshall, 1958; Shafland y Foote, 1983; Gilmore *et al.*, 1983) a las regiones subtropical-tropical del Océano Atlántico, por lo que se le puede encontrar a lo largo de la costa Oeste, desde "Pamlico Sound", Carolina del Norte, E.U. hasta Río de Janeiro, Brasil y algunas Islas del Caribe (Cuba y Haití) y las Antillas (Rivas, 1986). A lo largo de su distribución representa la base de importantes pesquerías ya sea para consumo humano -ya que la calidad de su carne, en cuanto a consistencia, contenido proteínico y sabor es alta (Tucker *et al.*, 1985)- ó como pesca deportiva.

Aunque en las zonas costeras se han observado migraciones relativamente cortas, esta especie lleva a cabo movimientos estacionales entre los cuerpos de agua dulce y marina (Rivas, 1986), que pueden ser de varias decenas de kilómetros. Este patrón de migración parece ser específico de cada población y en dependencia de la hidrografía de la zona. Así, mientras que para las poblaciones de robalo de Florida, Texas y Brasil no hay reportes de migraciones de gran distancia entre los ambientes de agua dulce y marina, Hernández (1988) menciona que anualmente, durante los meses de agosto-enero, se presentan migraciones de esta especie (a este evento los pescadores lo denominan arribazón) sobre el Río San Pedro, en el Estado de Tabasco, en tránsito hacia el Golfo de México, a una distancia de 150 Km de la costa en línea recta.

A pesar de la importancia que como recurso pesquero representa esta especie en las costas mexicanas del Golfo de México y el Caribe, en el país son escasos o nulos los estudios sobre aspectos biológicos de la especie. De esta forma, la mayor parte del conocimiento biológico sobre *C. undecimalis* proviene de estudios llevados a cabo en poblaciones de robalo de Florida, E.U. Estos estudios, sin embargo, no necesariamente reflejarían las condiciones ecológicas y biológicas de la especie en aguas costeras del Golfo de México, específicamente de las costas de Campeche.

En Florida, el robalo blanco (“common snook”, en inglés) es considerado desde los años 50’s como una especie “sujeta a protección especial”, debido a una reducción considerable en sus poblaciones provocada por la pérdida de hábitat, muerte natural y sobreexplotación pesquera a la que fue sometido. A partir del establecimiento de este status biológico se inició una serie de estudios enfocados al conocimiento de la biología, ecología, fisiología y de pesquerías con el objeto de contar con elementos para la regulación de las actividades pesqueras, desarrollar técnicas de cultivo en condiciones controladas con fines comerciales y para el repoblamiento del medio natural.

Los primeros estudios ecológicos, así como los relacionados a pesquerías, fueron llevados a cabo por el Departamento de Protección Ambiental de Florida (FDEP) (Marshall, 1958; Volpe, 1959). Investigaciones sobre la autoecología del robalo continuaron en Florida durante los 70’s y hasta los 90’s (Gilmore *et al.*, 1983; McMichael *et al.*, 1989), las cuales consideran tasas de crecimiento en juveniles así como cambios ontogénicos en hábitat y dieta. Trabajos adicionales tratan sobre la fisiología, específicamente sobre requerimientos de oxígeno disuelto (Peterson y Gilmore, 1988 y 1991; Peterson *et al.*, 1991) y alimentación (Luczkovich *et al.*, 1995).

El régimen alimenticio ha sido determinado en poblaciones de diversas localidades e indican que adultos de *C. undecimalis* presentan un régimen estrictamente ictiófago (Chávez *et al.*, 1989; Guevara *et al.*, 1994).

Información sobre temperaturas letales mínimas para juveniles (9 °C) y adultos (6 °C) fueron determinadas por Shafland y Foote (1983) y Howells *et al.* (1990), respectivamente. El desarrollo de larvas y juveniles cultivados en laboratorio fue descrito por Lau y Shafland (1982). Subsecuente información sobre aspectos generales incluye datos sobre temperatura de desove, reproducción y potencial de cultivo (Tucker, 1987; Tucker y Campbell, 1988; Wallace *et al.*, 1993; Tucker, 1998), identificación de hormonas liberadoras de gonadotropina (Sherwood *et al.*, 1993), desarrollo de la osteología (Fraser, 1968; Potthoff y Tellock, 1993), determinación de la edad larval (Tucker y Warlen, 1986) y osmoregulación en juveniles (Pérez-Pinzon y Lutz, 1991). Por otra parte, Taylor *et al.* (2000), basado en los criterios de

Sadovy y Shapiro (1987), determinan que el robalo blanco es una especie hermafrodita protándrica.

La temporada de desove para el robalo blanco ha sido determinada para varias localidades. A excepción de la reportada para Cuba, la temporada de reproducción coincide en Florida, E.U. (Marshall, 1958; Tucker y Campbell, 1988; Taylor *et al.*, 2000), Veracruz, México (Chávez, 1963), Campeche, México (Carvajal, 1975; Caballero *et al.*, 1997), Puerto Rico (Aliaume *et al.*, 2000) y Venezuela (Osorio y González, 1986) en que se presenta durante los meses de abril-mayo hasta septiembre-octubre, mientras que para Tunas de Zaza, Cuba ésta se presenta durante los meses de agosto-enero (Álvarez-Lajonchere *et al.*, 1982).

Los estudios sobre condiciones requeridas para desove, cultivo larval y siembra en agua dulce comenzaron en 1974 en la Florida Game and Fresh Water Fish Commission (Ager *et al.*, 1976; Chapman, 1976; Shafland y Koehl, 1979; Chapman *et al.*, 1982). Estos autores sientan las bases tecnológicas para el cultivo de esta especie utilizando GCH para la inducción a la ovulación y desove en organismos maduros recién capturados del medio. Esta metodología, con ligeras modificaciones, se sigue utilizando hasta la fecha, debido principalmente a la nula respuesta de hembras de robalo a madurar en condiciones de laboratorio y bajo diferentes tratamientos como: utilización de la hormona LHRHa + testosterona (Henderson-Arzapalo *et al.*, 1988b); diferentes regímenes de fotoperíodo y temperatura (Roberts, 1987; Henderson-Arzapalo *et al.*, 1988a) y en diferentes condiciones seminaturales como estanques y jaulas (Colura, 1989).

Recientemente, las líneas de investigación de varias instituciones de Florida han estado orientadas hacia el manejo del recurso pesquero, mejoramiento de las técnicas de cultivo y biología básica. En este último aspecto, sobresalen los trabajos sobre ritmos de desove natural (Taylor *et al.*, 1998), maduración testicular (Grier y Taylor, 1998), correlación endocrina de la maduración (Roberts *et al.*, 1999) y descripción del epitelio germinal ovárico (Grier, 2000; Grier y Lo Nostro, 2000). Por otra parte, estudios genéticos han sido llevados a cabo para la identificación de especies de la familia Centropomidae (Tringali y Bert, 1996; Tringali *et al.*, 1999a), analizar sus relaciones filogenéticas (Tringali *et al.*, 1999b) y para valorar el impacto

de los programas de repoblamiento en el pool génico de poblaciones silvestre (Tringali y Leber, 1999).

En cuanto al cultivo, actualmente cuatro instituciones en E. U. llevan a cabo investigaciones sobre esta especie; FDEP, Mote Marine Laboratory, Harbor Branch Oceanographic Institution y Aqua Technologies Group. Los resultados recientes de éstas se refieren al desarrollo de una metodología para el manejo de reproductores (con el objeto de reducir el estrés y mortalidad) y valoración del desarrollo gonadal (Neidig *et al.*, 2000a), comparación de dosis óptimas de GCH en relación con la ovulación, calidad de huevo y sobrevivencia larval (Neidig *et al.*, 2000b) y comparación de la efectividad de los implantes de cuatro formas análogas de la GnRH en la inducción a la ovulación (Skapura *et al.*, 2000).

Por otra parte, instituciones de Brasil, en cooperación con organismos canadienses (Universidad Federal de Santa Catarina, Brasil; sitio web: [www:\web.uvic.ca](http://www.web.uvic.ca)) y Ecuador (CENAIM-JICA, 1995) se han enfocado en años recientes al desarrollo de técnicas de cultivo, específicamente lo que se refiere a inducción a la maduración y desove en organismos mantenidos en cautiverio.

### III.1. Endocrinología de la Reproducción en Teleósteos

La mayoría de las funciones reproductivas, desde la gametogénesis hasta el comportamiento, dependen de las actividades de regulación del eje hipotálamo-pituitaria-gónada. Este eje endocrinológico, al igual que otros sistemas en los organismos, sufre de cambios en el desarrollo desde el nacimiento hasta la senectud, por lo que debe tenerse en cuenta que las actividades de regulación en un estadio de desarrollo no son iguales para otros estadios. Esta sinopsis de la endocrinología de la reproducción se enfocará principalmente al conocimiento actual en hembras de teleósteos.

### III.2. Funciones del Hipotálamo y Pituitaria

El hipotálamo descansa en la base del cerebro muy cerca de la glándula pituitaria. Es una estructura rica en neuronas cuyos productos secretorios son transportados directamente a la

pituitaria, en la mayoría de los teleósteos, vía neural; en contraste, en mamíferos, éste mecanismo se da a través de un especializado aporte sanguíneo portal. Por otra parte, ni el sistema portal especializado, ni la inervación directa se encuentran en la pituitaria de los agnatos o en el lóbulo ventral activo de la pituitaria de los condroictios, por lo que en estos peces es dudosa la regulación de la función de la pituitaria por el hipotálamo.

Dentro de las principales hormonas producidas en el hipotálamo de los peces se encuentran las conocidas como hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH), las cuales constituyen una familia de decapeptidos estructuralmente relacionados entre sí que difieren solo en uno ó más aminoácidos. La primera de estas hormonas se descubrió a principios de los 70's y se le denominó hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) o mGnRH (hormona liberadora de gonadotropina de mamífero). Hasta el momento se conocen 12 formas distintas de GnRH, de las cuales ocho han sido descubiertas en peces (Zohar, 2000). A continuación se presentan el nombre y la secuencia de aminoácidos que presentan estas ocho hormonas.

|                       | 1    | 2    | 3   | 4   | 5    | 6   | 7     | 8   | 9   | 10                  |
|-----------------------|------|------|-----|-----|------|-----|-------|-----|-----|---------------------|
| Mamífero (mGnRH)      | pGlu | His  | Trp | Ser | Tyr  | Gly | Lcu   | Arg | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Pollo-II (cGnRH-II)   | pGlu | His  | Trp | Ser | His  | Gly | Trp   | Tyr | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Salmón (sGnRH)        | pGlu | His  | Trp | Ser | Tyr  | Gly | Trp   | Leu | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Bagre (cfGnRH)        | pGlu | His  | Trp | Ser | His  | Gly | Leu   | Gln | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Seabream (sbGnRH)     | pGlu | His  | Trp | Ser | Tyr  | Gly | I.leu | Ser | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Pez perro (dfGnRH)    | pGlu | His  | Trp | Ser | His  | Gly | Trp   | Leu | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Lamprea-I (lGnRH-I)   | pGlu | IHis | Tyr | Ser | Leu  | Glu | Trp   | Lys | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |
| Lamprea-II (lGnRH-II) | pGlu | IHis | Trp | Ser | IHis | Asp | Trp   | Lys | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> |

En los agnatos se ha identificado una sola forma de GnRH, mientras que en los peces óseos y condroictios se ha establecido la coexistencia de dos a tres GnRH's distintas (Powell *et al.*, 1994), cuyas implicaciones funcionales son todavía inciertas. Una característica notable es que la forma molecular cGnRH-II generalmente es la que coexiste con una o más formas de GnRH-I en todos los grupos de vertebrados (Amano *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 1998). El robalo blanco, *C. undecimalis*, es una de las especies en las que se ha demostrado, de forma indirecta, la presencia de tres formas de GnRH (Sherwood *et al.*, 1993), lo cual está en concordancia con lo reportado por Zohar (2000) y Alok y Zohar (2000) en el sentido de que en todos los peces del orden perciforme coexisten tres formas de GnRH. En el robalo blanco estas tres formas son: cGnRH-II, sGnRH y sbGnRH.

Aunque las funciones de las GnRH's no se restringen a su participación en la regulación de las actividades reproductivas (Amano *et al.*, 1997), se considera que su principal función es la de regular primariamente la síntesis y secreción de las gonadotropinas FSH (GtH I) y LH (GtH II) (Melamed *et al.*, 1998). Entre otras funciones sugeridas están la de actuar como neuromodulador y/o neurotransmisor, además, la administración de GnRH exógeno favorece el comportamiento sexual en muchas especies de peces (Amano *et al.*, 1997).

El mecanismo de acción de las GnRH's en los teleósteos aún no se conoce con precisión, sin embargo, Hassin *et al.* (1998) han sugerido que la regulación de la FSH y LH se lleva a cabo de forma diferencial a través de la acción de las múltiples formas de GnRH's y vía uno o más tipos de receptores específicos localizados en las membranas de las células gonadotropas (células que producen gonadotropinas). Sin embargo, lo anterior no puede generalizarse ya que a la fecha solo un tipo de receptor funcional ha sido caracterizado en peces perciformes (Alok y Zohar, 2000 y Zohar, 2000). Además, Zohar (2000) menciona que solo una de las tres formas de GnRH es dominante (y específica para cada especie) en la pituitaria y se ha comprobado que al mismo tiempo es la más importante para regular el desarrollo gonadal final y la secreción de la LH.

El término gonadotropina (GtH) se refiere en particular a las glucoproteínas de la glándula pituitaria. Estas hormonas, junto con la gonadotropina coriónica de los mamíferos (por ejemplo GCH) y la hormona estimuladora de la tiroides (TSH), están relacionadas químicamente, y son glucoproteínas heterodiméricas formadas por una subunidad  $\alpha$  unida de forma no covalente a una subunidad  $\beta$ . La subunidad  $\beta$  es la que confiere la especificidad biológica de la hormona (Carrillo y Zanuy, 1993).

En varias especies de teleósteos se ha demostrado, mediante el uso de análisis bioquímicos y estudios de clonación molecular, que éstos presentan dos formas de gonadotropinas: la GtH I, la cual es estructural y funcionalmente comparable a la hormona estimuladora de los folículos de los mamíferos (FSH); y la GtH II, homóloga a su vez de la hormona luteinizante (LH) (Gen *et al.*, 2000). Esta dualidad de las gonadotropinas fue inicialmente sugerida por Idler y Ng (1983) ya que anterior a esa fecha se tenía el concepto de que solamente una gonadotropina

era la responsable del desarrollo gonadal de los peces. Actualmente, esta dualidad se puede extender a todas las especies de teleósteos, ya sean primitivos, como la anguila, o modernos, como los perciformes (Yoshiura *et al.*, 1999).

La secreción de gonadotropinas en los teleósteos, especialmente la LH, está sujeta a una doble regulación neuroendocrina: inhibidora y estimuladora. En un gran número de teleósteos está bien establecido que la GnRH estimula la liberación de la gonadotropina hipofisiaria y que por otro lado, esta liberación se ve inhibida por el GRIF o factor inhibidor de la gonadotropina, que generalmente se le identifica con la dopamina (DA). Otros factores que intervienen en la modulación de la liberación de las gonadotropinas se pueden clasificar en tres grandes grupos (Groves y Batten, 1986; Breton *et al.*, 1989; Peter *et al.*, 1990; Somoza y Peter, 1991):

- Neuropéptidos, como los opioides, el neuropéptido Y (NPY) y la GnRH
- Monoaminas, como la norepinefrina (NE), serotonina (SE) y la dopamina (DA)
- Aminoácidos, como el ácido gamma amino butírico (GABA) y el aspartato (ASP)

Estos conocimientos han tenido aplicaciones prácticas en acuicultura; un protocolo que ha demostrado ser más efectivo en la inducción a la ovulación en algunas especies de peces es la administración simultánea, más que individual, de moléculas análogas a la GnRH y un antagonista de la dopamina (pimozide y domperidone, principalmente). Sin embargo, no se pueden hacer generalizaciones a todas las especies, ya que existen diferencias específicas para los mecanismos reguladores de las gonadotropinas, por ejemplo, se ha demostrado que la dopamina no inhibe la secreción de LH en miembros de la familia Scianidae (Copeland y Thomas, 1989).

Aunque la función precisa de cada una de las gonadotropinas no está bien definida (Melamed *et al.*, 1998), se considera que éstas son moduladoras críticas de la gametogénesis y esteroidogénesis gonadal en casi todos los vertebrados, incluyendo a los teleósteos (Nagahama, 1987; Gen *et al.*, 2000). En salmónidos, por ejemplo, se ha determinado que la gametogénesis y la esteroidogénesis son promovidas por gonadotropinas, aunque la contribución relativa de cada forma varía dependiendo del estadio de desarrollo de los peces (Suzuki *et al.*, 1988; Swanson, 1991).

La FSH es la gonadotropina predominante en pituitaria y sangre de peces cuyas gónadas se encuentran en la fase de crecimiento activo, incluyendo síntesis de estradiol, vitelogénesis y espermatogénesis. En contraste, la LH es predominante durante la fase de madurez gonádica final y ovulación (Melamed *et al.*, 1998; Yoshiura *et al.*, 1999), sin embargo, recientemente se ha comprobado en varias especies la ocurrencia de un incremento significativo en la secreción de FSH en la fase final de la madurez gonádica, igual que acontece en mamíferos, lo cual sugiere que la FSH en teleósteos es necesaria como un mecanismo de sensibilización para los receptores de la LH (Patiño *et al.*, 2001).

### III.3. Gametogénesis

Las gónadas de los teleósteos adultos son estructuras pareadas y se componen de dos tipos básicos de células: germinales y somáticas, las primeras dan lugar a gametos (hucvos o espermatozoides) y las segundas sirven de soporte, alimentación y ayudan a regular las actividades y desarrollo de las células germinales. El ovario es del tipo cistovárico y las lamelas ovígeras, que contienen a los ovocitos en desarrollo, usualmente se extienden al lumen (ovocelo).

La unidad básica del ovario, desde el punto de vista morfológico y funcional, es el folículo ovárico, cuya organización es similar en todos los teleósteos. El folículo se compone básicamente de un ovocito, localizado en posición central; la zona radiata o corión y las células foliculares. Las células foliculares están compuestas por una monocapa interior de células de granulosa y les rodea una capa exterior de células tecaes, separadas por una membrana basal.

La gametogénesis se refiere a los procesos de proliferación mitótica, división meiótica, y diferenciación de células germinales a partir de ovogonias (células germinales primarias diploides) hasta gametos maduros (haploides), ya sea espermatozoides en machos (espermatoogénesis) ó hucvos en hembras (ovogénesis). Sin embargo, tanto la espermatoogénesis como la ovogénesis son procesos muy diferentes: a) en la ovogénesis la meiosis es interrumpida dos veces durante el desarrollo de los ovocitos, mientras que la

espermatogénesis es un proceso ininterrumpido; b) durante el período de meiosis, los espermatoцитos normalmente decrecen en tamaño, mientras que los ovocitos crecen significativamente durante este período; c) la maduración final del esperma termina solo después de concluida la meiosis, mientras que la maduración de los ovocitos, en el folículo ovárico, ocurre antes de terminar la meiosis y d) cada ovogonia produce un huevo funcional, mientras que cada espermatogonio que entra a la meiosis produce cuatro espermatoцитos.

### III.3.1. Espermatogénesis

La espermatogénesis en peces es fundamentalmente similar a la presentada en otros vertebrados (Nagahama, 1983). Las diferencias entre taxas son superficiales, típicamente relacionadas a la morfología del testículo y espermatoзоиде, el número de divisiones espermatogoniales antes de la meiosis, y al momento (“Timing”) entre estadios de desarrollo sucesivos. Cambios citológicos característicos durante la espermatogénesis incluyen la proliferación mitótica de células espermatogoniales y la subsecuente diferenciación de algunas hacia espermatoцитos primarios. La primera división meiótica marca la conversión de espermatoцитos primarios hacia espermatoцитos secundarios, los cuales a su vez, llevan a cabo una segunda división meiótica para formar espermátidas.

Durante la espermiogénesis las espermátidas maduran, forman el flagelo y se separan de sus células de soporte (células de Sertoli) para llegar a ser espermatoцитos. Estos últimos son colectados en los ductos eferentes, de donde son expulsados durante la espermiación. Los mecanismos de regulación hormonal para la espermatogénesis incluyen: proliferación espermatogonial y esteroidogénesis testicular en las células de Leydig y células de Sertoli, inducidos por GtH's.

### III.3.2. Ovogénesis

Una ovogonia se convierte en un ovocito al momento de entrar a la meiosis. En todas las especies de vertebrados el primer bloqueo o arresto meiótico de la ovogénesis ocurre en la

profase I. El ovocito meiotico es liberado de este bloqueo durante la maduración, pero una vez más vuelve a detenerse cuando alcanza la metafase II. El ovocito maduro, o huevo, entonces estará listo para la fertilización. La fertilización del huevo provoca la liberación del segundo bloqueo y la conclusión de la segunda división meiótica (Masui, 1985).

#### III.3.2.1. Crecimiento vitelogénico

La mayor parte del crecimiento de los ovocitos de los vertebrados ocurre durante el periodo del primer arresto meiótico. Este crecimiento es debido a que la vitelogenina circulante en sangre, la cual después de sufrir modificaciones, es depositada como vitelo en el ovocito (Nagahama *et al* , 1995). La vitelogenina es producida por el hígado en respuesta al estradiol, el cual a su vez es producido por las células foliculares ováricas en respuesta a un incremento en los niveles sanguíneos de gonadotropina (Nagahama, 1987). En salmónidos, la producción de estradiol folicular está regulada por la FSH (Swanson *et al.*, 1991).

#### III.3.2.2. Maduración del ovocito

La maduración del ovocito comprende el periodo entre la liberación de la profase I y el arresto o bloqueo en la metafase II (Nagahama *et al.*, 1995). No obstante, criterios morfológicos tales como la migración de la vesícula germinal y la fusión de las vesículas de vitelo proteínico y lipídico son ampliamente usados como índices del inicio de la maduración (Goetz, 1983; Redding y Patiño, 1993). Asimismo, en algunos teleósteos, especialmente marinos, los procesos anteriores son acompañados de una marcada hidratación, resultando en un aumento considerable en el volumen de los ovocitos (Wallace y Selman, 1981).

El control hormonal de la maduración de los ovocitos en peces ha sido mejor estudiado en salmónidos. En estas especies la LH, actuando al nivel de las células foliculares, induce la producción de esteroides inductores de la maduración de los ovocitos (MIS). Según los estudios de Nagahama y Yamashita (1989) éste proceso se da en dos pasos; en el primero, la LH induce la síntesis del esteroide  $17\alpha$ -hydroxy-4-pregnen-3-one por las células de la teca, mientras que en el segundo paso, también bajo control de la LH, este esteroide es convertido

por las células de la granulosa a  $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one. Este último esteroide es el MIS de muchos de los teleósteos estudiados. Una vez producido este esteroide, atraviesa la zona radiada para alcanzar el interior del ovocito e inducir a la maduración.

Al igual que para los mecanismos reguladores de las gonadotropinas, el mecanismo descrito anteriormente y los esteroides involucrados (MIS) no pueden ser generalizados a todas las especies de teleósteos, ya que existen diferencias específicas para cada grupo. Por ejemplo, Wallace *et al.* (1993) realizó ensayos con los esteroides anteriormente mencionados, en ovocitos de robalo blanco *in vitro*, con resultados negativos en cuanto a la inducción a la maduración.

Por otra parte, Patiño y Thomas (1990) y Patiño *et al.* (2001) sugieren que el proceso de la maduración final del ovocito se da en dos etapas, en la primera, las células foliculares adquieren la sensibilidad para producir dichos esteroides, y el ovocito para responder a estos (competencia maduracional del ovocito); mientras que en la segunda etapa, ocurre la producción de esteroides por las células foliculares y consecuentemente el ovocito es liberado del arresto meiótico. Por ello, estos autores sugieren que el proceso -comúnmente llamado "maduración final del ovocito"-, se le designe apropiadamente "maduración folicular ovárica".

#### III.3.2.3. Ovulación

La ovulación se refiere a la expulsión del ovocito maduro de su folículo. En la mayoría de los vertebrados, la ovulación es inducida por gonadotropinas y normalmente es un proceso que precede a la maduración del ovocito. Sin embargo, aunque la maduración y la ovulación comparten el mismo estímulo hormonal primario (inducción por gonadotropinas), se ha observado que cada evento es mediado por mecanismos diferentes (Goetz *et al.*, 1991).

#### III.3.3. Inducción hormonal

Los primeros intentos de manipulación de las rutas endocrinas relacionadas con las funciones reproductivas, y a las cuales se les denominó técnicas de "primera generación" (Donaldson *et*

*al.*, 1982), se llevaron a cabo con extractos de pituitaria de la misma especie (homoplástica) o de diferente especie (heteroplástica) a la cual se quería inducir. Posteriormente, se utilizaron glándulas preservadas de pituitaria, preparaciones de gonadotropina parcialmente purificadas y gonadotropinas de mamíferos, especialmente GCH (Donaldson, 1973). En México y en varias partes del mundo donde se cultiva la carpa común, por ejemplo, el protocolo consiste generalmente de dos inyecciones de extractos de pituitaria; la primera aplicación estimula el inicio de la maduración final al provocar la producción de esteroides que inducen a la maduración (MIS), mientras que la segunda inyección, dosis de resolución, dispara la producción de MIS y la ovulación. Las desventajas de la utilización de estas técnicas son la ausencia de estandarización de las preparaciones de gonadotropina, suficiente disponibilidad de glándulas de pituitaria de peces y respuestas inmunes a la inyección de preparaciones heteroplásticas (Donaldson *et al.*, 1982; Patiño, 1997).

Las técnicas de "segunda generación" aparecieron a principios de los 80's. Involucran la regulación de la producción y/o liberación de gonadotropinas endógenas mediante el uso de hormonas liberadoras de gonadotropinas, antiestrógenos, progestinas y prostaglandinas (Donaldson *et al.*, 1982). Recientemente, la producción comercial de agonistas sintéticos de la LHRH han hecho que estas técnicas de inducción al desove sean más confiables y a un costo más justificable que las técnicas de la primera generación.

El diseño de estos análogos superactivos, cuya potencia *in vivo* es de 50 a 200 veces mayor que la LHRH nativa, se basa en el principio de que la sustitución de ciertos aminoácidos en la secuencia peptídica de la molécula como la posición 6 y la posición 8 provee resistencia a la degradación metabólica, estabilización de la conformación del péptido (Peter *et al.*, 1987; Crim *et al.*, 1988) y alta afinidad de enlace al receptor de LHRH de la pituitaria (Patiño, 1997).

La aplicación de hormonas para inducir al desove se lleva a cabo mediante dos sistemas básicos de liberación: a) aquellas que producen una exposición aguda a la hormona y b) aquellas que producen una exposición sostenida o crónica (Patiño, 1997). El primer sistema es generalmente a través de una o varias inyecciones intramusculares o intraperitoneales ó vía

oral, mediante la administración de las hormonas en el alimento. El segundo sistema es usado mas ampliamente y se basa en la incorporación de la hormona en pellets. El implante de estos pellets favorece una liberación prolongada de la hormona, al mismo tiempo que se minimiza el manejo de los organismos.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Marina Experimental ubicado en Cd. del Carmen, Campeche, perteneciente a la Facultad de Ciencias de la UNAM. Para el cumplimiento de los objetivos, el trabajo se dividió en dos partes; la primera comprendió la caracterización histológica del desarrollo gonadal de hembras de robalo blanco, utilizando gónadas de organismos provenientes de la captura comercial en las inmediaciones de Cd. del Carmen, Campeche y en la segunda parte se llevaron a cabo tres ensayos experimentales para valorar el efecto de las hormonas GCH y LHRHa en el comportamiento reproductivo de hembras de robalo blanco, utilizando organismos vivos capturados en la Laguna de Términos, Campeche.

### IV.1. Caracterización Histológica de los Diferentes Estadios Gonadales de Hembras de Robalo Blanco.

Se llevó a cabo una correlación entre las características histológicas en preparaciones en fresco y permanentes de los diferentes estadios gonadales de hembras silvestres de robalo blanco durante un ciclo reproductivo anual. Esto se hizo con el objeto de identificar aquellas características que pudieran ser utilizadas como indicadores confiables para determinar las diferentes fases de la ovogénesis a partir de preparaciones histológicas en fresco.

#### IV.1.1. Colecta de las gónadas

Se colectaron mensualmente gónadas de hembras de robalo blanco a lo largo de un ciclo anual a partir de las capturas comerciales de los pescadores ribereños de Ciudad del Carmen, Campeche. En el momento del desembarco, los peces fueron medidos y pesados y las gónadas fueron extraídas y llevadas inmediatamente al laboratorio donde se pesaron con una balanza con precisión de 0.01 gr. Se registraron varias características macroscópicas de las gónadas como coloración, grado de enervación, textura y aspectos generales. Un lóbulo de la gónada se utilizó para llevar a cabo la caracterización en preparaciones histológicas en fresco, mientras que el otro fue colocado en solución de Bouin para su posterior análisis histológico en preparaciones permanentes.

Con los datos de los pesos de la gónada y del pez se determinó el índice gonadosomático (IGS) de acuerdo a la siguiente fórmula (Rodríguez, 1992b):

$$\text{IGS} = [ (\text{peso de la gónada} \times 100) / (\text{peso del pez}) ]$$

#### IV.1.2. Preparaciones histológicas en fresco

Con muestras tomadas inmediatamente a la llegada de la gónada al laboratorio, se determinó el diámetro en fresco de al menos 100 ovocitos, tomados aleatoriamente de las partes anterior, media y posterior de un lóbulo, bajo un aumento de 10X ó 40X en un microscopio binocular. Asimismo, se determinaron las características morfológicas sobresalientes de los ovocitos como: coloración, aspecto, presencia de la gota lipídica y posición y tamaño de la vesícula germinal (núcleo). Para esto último, se utilizó la solución aclaradora Serrá (Álvarez-Lajonchere y Molejón, 1994) cuando los ovocitos se observaban opacos (ovocitos vitelogénicos, principalmente).

Con el objeto de contrarrestar el desecamiento y posible variación del volumen de los ovocitos al momento de determinar el diámetro, se utilizó una solución isosmótica de formol al 1 %, con agua de mar a 12 ‰. Esta solución fue elaborada a partir de un ensayo previo en el que se determinó que la concentración osmótica de los ovocitos en estado de vitelogénesis es de aproximadamente 400 mOsm. Con base en lo anterior, se midió la presión osmótica de varias combinaciones de formol al 1% y agua de mar a diversas salinidades y se determinó que una solución de formol al 1% con agua de mar a 12 ‰ presentaba una presión osmótica similar a la de los ovocitos de *C. undecimalis*. Además, se realizó un ensayo para determinar la variación en el tamaño de los ovocitos conservados en esta solución. Los ovocitos fueron mantenidos en esta solución durante un mes y no se encontró una variación estadísticamente significativa (p. 0.05) en el diámetro promedio.

#### IV.1.3. Preparaciones histológicas permanentes

Las gónadas fueron mantenidas de 24 a 36 horas en solución de Bouin y posteriormente fueron lavadas en agua corriente y colocadas en alcohol al 70 % hasta su posterior procesamiento. Se hicieron cortes de aproximadamente 5 mm de ancho de la parte media del lóbulo para posteriormente llevar a cabo el proceso de deshidratación en diluciones sucesivas de alcohol del 70 % al 100 %. Los tejidos fueron incluidos en parafina y se hicieron cortes de 5-6  $\mu\text{m}$  en un micrótomo de rotación para posteriormente teñir las secciones con hematoxilina-eosina (Aguilar *et al.*, 1996). Inicialmente se llevó a cabo una prueba donde se tomaron muestras de la parte media, anterior y posterior del lóbulo y se determinó que no existían variaciones en cuanto a la distribución y grado de madurez de los ovocitos, por lo que se utilizó solo tejido de la parte media del lóbulo para este tipo de preparaciones.

La identificación de los diferentes estadios gonadales se basó en las descripciones hechas por Yamamoto y Yamazaki (1961), Yamamoto y Yoshioka (1964), Wallace y Selman (1981) y Selman y Wallace (1989), principalmente cambios en el tamaño, posición y/o características de los constituyentes celulares de los ovocitos como son la vesícula germinal, nucleolos, gránulos de vitelo, vesículas de vitelo, vesículas de lípidos y gota lipídica, entre otros.

#### IV.2. Efecto de la Aplicación de las Hormonas LHRHa y GCH en el Comportamiento Reproductivo del Robalo Blanco.

Se llevaron a cabo tres ensayos en diferentes etapas reproductivas del robalo blanco bajo condiciones de cautiverio con el objeto de evaluar el efecto de la aplicación de las hormonas LHRHa y GCH en el comportamiento reproductivo de esta especie (Tabla I). El efecto crónico de la LHRHa (mediante implantes) fue evaluado durante las épocas no-reproductiva y reproductiva, y el efecto agudo de la LHRHa y GCH (a través de inyecciones) fue evaluado durante la época reproductiva en hembras vitelogénicas.

Tabla I. Diseño experimental de los ensayos.

|          |               | Hormona | Tipo de Aplicación | Dosis                   | Temporada de Reproducción | Aplicación a:        |
|----------|---------------|---------|--------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------|
| Ensayo 1 | Tratamiento 1 | LHRHa   | Implante IM        | 50 $\mu$ g/pellet/org.  | No Reproductiva           | Todos los organismos |
|          | Tratamiento 2 |         | Implante IM        | 100 $\mu$ g/pellet/org. |                           | Todos los organismos |
| Ensayo 2 | Tratamiento 1 | LHRHa   | Implante IM        | 200 $\mu$ g/pellet/org. | Reproductiva              | Todos los organismos |
|          | Tratamiento 2 |         | Implante IM        | 300 $\mu$ g/pellet/org. |                           | Todos los organismos |
| Ensayo 3 | Tratamiento 1 | LHRHa   | Inyección IM       | 100 $\mu$ g/Kg          | Reproductiva              | Solo vitelogénicos   |
|          | Tratamiento 2 | GCH     | Inyección IM       | 500 UI/Kg               |                           | Solo vitelogénicos   |

#### IV.2.1. Captura y mantenimiento de reproductores

Los organismos de *C. undecimalis* fueron capturados en el interior del sistema lagunar de la Laguna de Términos y en el mar, frente a la boca, utilizando como arte de pesca una red de arrastre de luz de malla de siete centímetros con tiempos máximos de arrastre de 5 a 7 min. (Fig. 1). Debido a que generalmente en las zonas anteriores no se encuentran organismos en avanzado estado de madurez gonádica, la selección de los mismos se llevó a cabo basándose en los datos de talla mínima de madurez reportados por diversos autores como: Tucker y Campbell (1988) en la costa de Miami: machos 1.7 kilos y 49 centímetros de longitud furcal (cm LF) y hembras 2.4 kilos y 58 cm LF; Álvarez-Lajonchere *et al.* (1982) en Cuba: machos de 30 a 33 cm de longitud total (cm Lt) y hembras 42 a 45 cm Lt; Osorio y González (1986) en Venezuela: machos 55 cm Lt y hembras 60 cm Lt. El transporte de los organismos al laboratorio se efectuó en un recipiente de 400 litros de capacidad situado en el interior de la lancha. Durante el transporte, de una a dos horas aproximadamente, se realizaron cambios parciales de agua con el objeto de mantener en condiciones favorables el agua de transporte.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

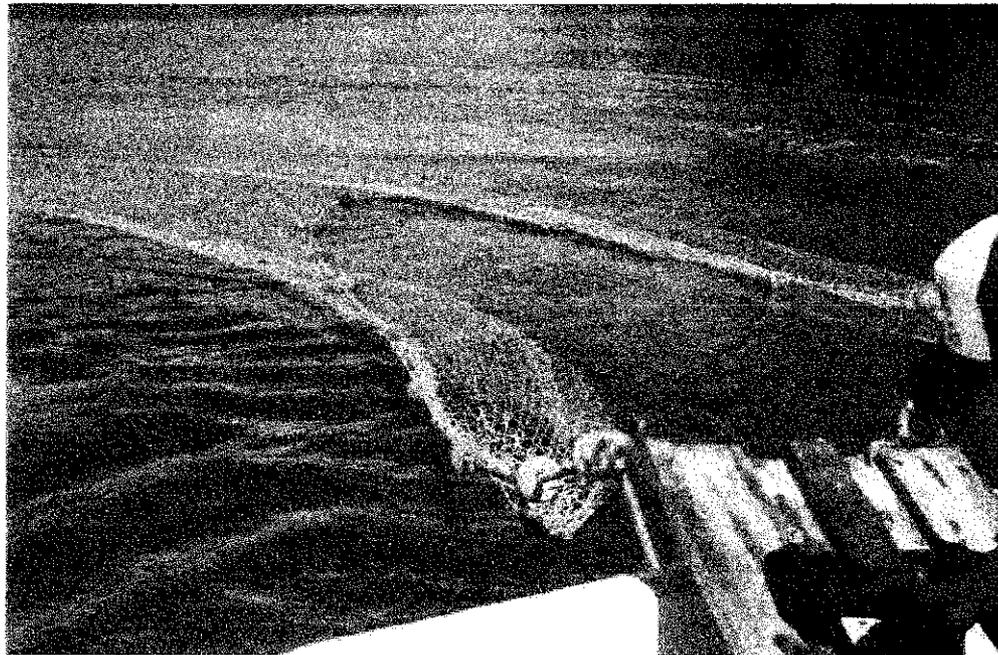


Fig. 1. Arte de pesca utilizado para la captura de robalo blanco en la Laguna de Términos, Campeche.

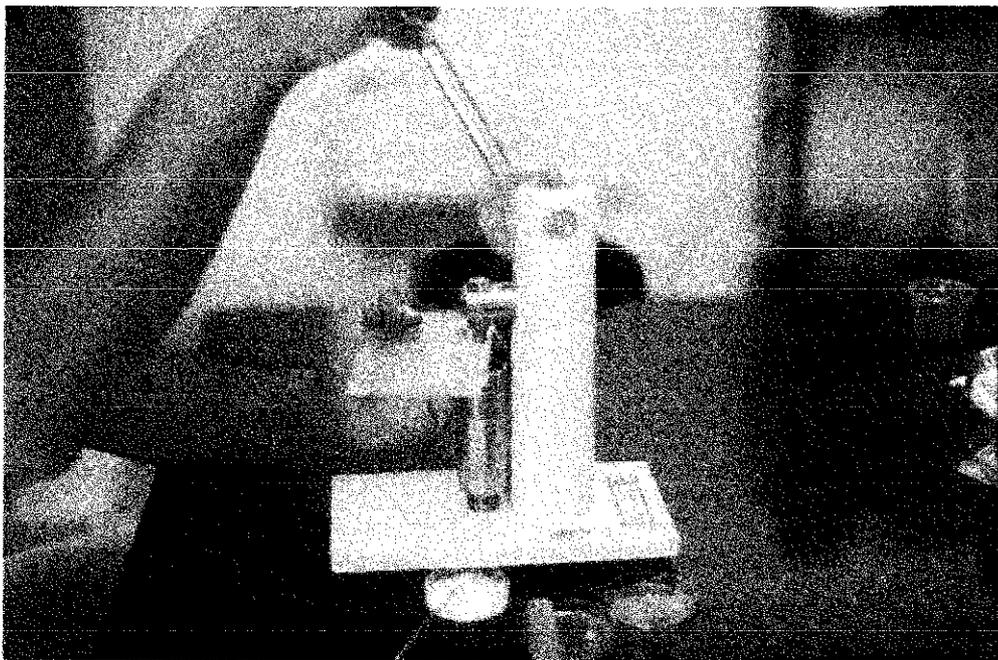


Fig. 2. Preparación de los pellets usando peletizadora y molde de acrílico.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Una vez en el laboratorio, los organismos fueron mantenidos en estanques circulares de 20 m<sup>3</sup> y sometidos a un tratamiento profiláctico con verde de malaquita (Thouard *et al.*, 1994). Si presentaban algún daño superficial en la piel se les aplicaba azul de metileno. Posteriormente fueron mantenidos en cuarentena hasta el inicio de los ensayos, lo cual ocurrió una vez que los organismos se adaptaron a las condiciones de cautiverio e ingirieron alimento de forma continua, lo cual en algunos organismos ocurrió hasta transcurrido un mes aproximadamente.

#### IV.2.2. Hormonas utilizadas y elaboración de los pellets

Se utilizaron las hormonas des-Gly<sup>10</sup>, [D-Ala<sup>6</sup>]-LHRH ethylamide (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ala-Leu-Arg-Pro-NHEt); Sigma Chemical Co. (LHRHa) y gonadotropina coriónica humana (GCH) (“Profasi”, Laboratorios Serono, en presentación de 5000 UI). La elaboración de los pellets conteniendo LHRHa se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Lee *et al.* (1986a), que en resumen consiste en: disolver la hormona en alcohol etílico y dejarla evaporar a temperatura ambiente. Posteriormente se homogeneizó con colesterol grado reactivo y 5% de manteca de cacao. Con esta mezcla se hicieron los pellets utilizando un molde de acrílico con perforaciones de 3/8” de diámetro y una peletizadora manual (Pellet Press, Parr, Fig. 2). Los pellets tuvieron un peso promedio de 20 mg y concentraciones de la hormona según los ensayos: 50, 100, 200 ó 300 µg.

#### IV.2.3. Aplicación de las hormonas y manipulación de los organismos

La metodología para los implantes (ensayos 1 y 2) e inyecciones (ensayo 3), así como para la revisión de la condición de madurez gonádica (mensualmente, durante los ensayos) de machos y hembras de robalo blanco, se realizó de la siguiente manera:

Los pellets e inyecciones fueron aplicados intramuscularmente (IM) en la región dorsolateral (de tres a cinco escamas abajo del inicio de la segunda aleta dorsal), mediante una pistola de implante de uso veterinario con agujas esterilizadas del número 10 y jeringa de 5 mm (Fig. 3), respectivamente. En el caso de los implantes, fue retirada previamente una escama de la zona de implante para permitir la introducción de la aguja. Al momento del implante los pellets

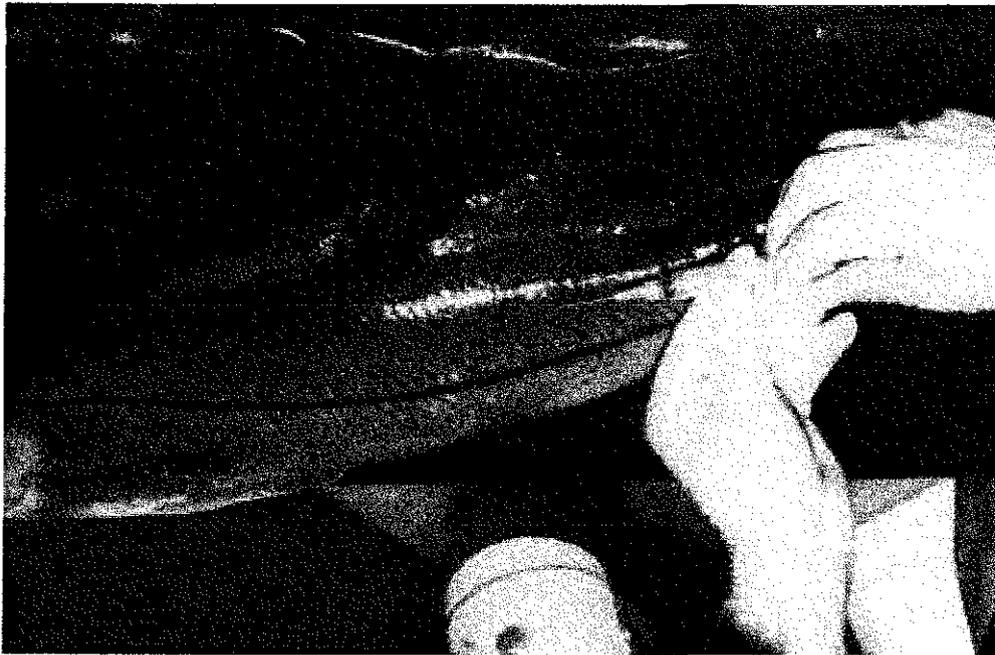


Fig. 3. Aplicación de una inyección de GCH en una hembra de robalo blanco.



Fig. 4. Biopsia ovárica mediante canulación de una hembra de robalo blanco.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

fueron cubiertos con polvo de antibiótico y la zona de implante fue impregnada con azul de metileno. En ningún caso se detectó infección alguna en la zona del implante. Además, como medida profiláctica posterior al manejo, los organismos fueron sometidos a un baño de verde de malaquita (0.03 ppm) por espacio de 45-60 minutos, antes de regresarlos al estanque.

La aplicación de los implantes se llevó a cabo cada mes independientemente del grado de madurez gonádica; solo se registraba el desarrollo de ésta. En el ensayo tres, solo se realizó la aplicación de las inyecciones (conteniendo LHRHa o GCH, dependiendo del tratamiento) a las hembras detectadas en fase de crecimiento secundario (vitelogénesis).

Al inicio del primer ensayo, los organismos fueron marcados individualmente para su identificación, mediante la colocación de una marca numérica entre los radios de la aleta dorsal. Debido a que la marca se desprendía constantemente, para el segundo y tercer ensayo se utilizaron marcas plásticas de diferentes colores.

Mensualmente los organismos fueron pesados, medidos y valorados en su condición gonádica mediante un ligero masaje en el abdomen y/o la introducción de una cánula en el poro genital (Fig. 4) con el objeto de obtener una muestra de los productos sexuales para conocer el grado de avance en la madurez gonádica.

Tanto la colocación de las marcas, implantes, inyecciones y canulación se llevó a cabo con los organismos previamente anestesiados con MS-222 (100 ppm; Tucker, 1998).

### IV.3. Diseño Experimental

#### IV.3.1. Efecto crónico de la hormona LHRHa en el comportamiento reproductivo del robalo blanco mediante la aplicación de implantes.

Se llevaron a cabo dos ensayos para valorar el efecto, en el comportamiento reproductivo, de la aplicación mensual de la hormona durante los periodos no reproductivo y reproductivo, respectivamente. En el primero se utilizaron dosis de 50 y 100  $\mu\text{g}$  de LHRHa por animal/pellets y en el segundo dosis de 200 y 300  $\mu\text{g}$  de LHRHa por animal/pellets (Tabla I).



Estas dosis están dentro de los rangos utilizados con éxito por algunos autores para otras especies, tanto para acortar el periodo natural de reproducción (inducir a la maduración) como para inducir a la remaduración final y ovulación (Tucker, 1998).

#### IV.3.1.1. Primer ensayo

En este primer ensayo se probó el efecto de la aplicación mensual de implantes IM de pellets conteniendo una dosis de 50 y 100  $\mu\text{g}$  de LHRHa por tratamiento. Se utilizaron veinte organismos con un rango de longitud de 56 a 77 cm. Se seleccionaron al azar los organismos para formar dos lotes de diez organismos cada uno, los cuales fueron asignados a cada tratamiento. Dentro de cada lote/tratamiento se seleccionaron dos organismos como controles a los cuales se les aplicó un implante IM sin hormona, a los ocho restantes se les implantaron pellets con dosis de 50 y 100  $\mu\text{g}$ , según tratamiento. Debido a la imposibilidad de diferenciar organismos machos y hembras en esta especie debido a la ausencia de dimorfismo sexual, al inicio de los ensayos no se pudo conocer la proporción inicial de machos y hembras. Además, cuando se llevó a cabo este ensayo no se tenía el antecedente de la condición de protandria que presenta esta especie (Taylor *et al.*, 2000), por lo que suponíamos una proporción inicial hembra:macho de 50:50.

Los implantes se llevaron a cabo mensualmente durante el periodo comprendido de agosto a diciembre de 1998. Los organismos fueron alimentados *ad libitum* seis veces a la semana con alimento fresco-congelado que consistía en una combinación de camarón, "cintilla", calamar y sardina. Diariamente se registraron las siguientes variables físico-químicas del agua de los estanques: temperatura, oxígeno disuelto (con un oxímetro, YSI 55) y salinidad (con un refractómetro Atago, modelo S/Mill-E). Diariamente se sifoneaban los estanques para la eliminación de heces, restos de comida y limpieza en general, asimismo se realizaban cambios parciales de agua.

#### IV.3.1.2. Segundo ensayo

En este ensayo se probó el efecto de la aplicación mensual de implantes IM de pellets a dosis de 200 y 300  $\mu\text{g}$  de LHRHa por tratamiento. El número de organismos por tratamiento fue de ocho (seis implantados con hormona y dos controles), mismos que fueron utilizados en el ensayo 1, excepto los sacrificados para valorar su condición gonádica. El rango en longitud y peso de estos organismos fue de 64.5-82 centímetros y 2-4.3 kilos, respectivamente. La metodología fue similar al ensayo anterior excepto en que cada tercer día se les proporcionó a los organismos cápsulas de aceite de hígado de bacalao (una cápsula de 1 gramo por animal, en promedio) como complemento alimenticio. Este ensayo tuvo una duración de cinco meses y se realizó durante los correspondientes a la época de maduración del robalo en su medio natural.

#### IV.3.2. Efecto agudo de las hormonas LHRHa y gonadotropina coriónica humana en la inducción al desove del robalo blanco mediante inyecciones intramusculares

##### IV.3.2.1. Tercer ensayo

A partir de los resultados negativos de los ensayos anteriores se decidió evaluar el efecto de la aplicación aguda de las hormonas LHRHa y GCH sobre la inducción a la maduración final y ovulación de hembras de *C. undecimalis*. La aplicación de las inyecciones se llevó a cabo en hembras en fase temprana de la vitelogénesis. Los machos no fueron inyectados. Se utilizaron 18 organismos separados en dos grupos de nueve cada uno (siete experimentales y dos controles), para los tratamientos con LHRHa y GCH, respectivamente.

La revisión de la condición de madurez gonádica se llevó a cabo mensualmente mediante el procedimiento de canulación, descrito previamente y utilizando como indicador de madurez el diámetro de los ovocitos (diámetros entre 350 y 450  $\mu\text{m}$ ) y la posición de la vesícula germinal.

Al momento de detectar una hembra en fase de vitelogénesis, se procedió a inyectarla con LHRHa o GCH, dependiendo del tratamiento, y fue separada del resto de los organismos en

un recipiente de 2 m X 30 cm, con aireación constante. A partir de las 24 horas post-inyección se realizaron biopsias ováricas cada 2 a 4 horas, dependiendo de la evolución del desarrollo gonadal y hasta la detección de la ovulación. Inmediatamente se procedió al desove, mediante un ligero masaje en el abdomen y a la fertilización artificial. En organismos machos se decidió no aplicar el tratamiento hormonal ya que la literatura reporta que en organismos machos en cautiverio, no se presenta la inhibición de la espermatogénesis, lo cual fue corroborado en este estudio. La colecta de esperma se llevó a cabo mediante un ligero masaje y/o insertando una cánula en el orificio genital.

## V. RESULTADOS

### V.1. Caracterización Histológica de los Diferentes Estadios Gonadales de Hembras de robalo blanco.

Un total de 69 gónadas fueron colectadas durante un ciclo anual comprendido de julio de 1998 a junio de 1999. Después de los análisis histológicos, las gónadas fueron clasificadas en siete categorías acordes al estadio de madurez más avanzado de los ovocitos: perinucleólo (Fig. 5a), alveolo cortical (Fig. 5b), vitelogénesis primaria, vitelogénesis secundaria, vitelogénesis terciaria (Fig. 6), maduración final (Fig. 7) y ovulación (Fig. 8). La caracterización de cada uno de estos estadios y su correlación con las preparaciones histológicas en fresco se describen en la Tabla II.

Las características resultantes de las preparaciones histológicas en fresco fueron utilizadas como criterios para determinar el grado de madurez gonádica de las hembras. Esta determinación se llevó a cabo en muestras obtenidas mediante biopsias ováricas en los diferentes ensayos de inducción hormonal. Sin embargo, por cuestiones prácticas en cuanto a su uso en acuicultura, se decidió agruparlas en sólo cuatro estadios (Tabla II): previtelogénesis (Fig. 9), vitelogénesis (Fig. 10), maduración final (Fig. 11) e hidratación (ovulación; Figs. 12 y 13). El estadio de vitelogénesis, a su vez, fue subdividido en tres fases: primaria, secundaria y terciaria.

Así, los criterios utilizados para determinar las fases previtelogénicas (perinucleólo y alvéolo cortical) fueron la presencia de ovocitos claros y diámetros de hasta 200  $\mu m$  (Fig. 9); durante el estadio de vitelogénesis, los principales criterios utilizados fueron el diámetro de los ovocitos, cuyo rango abarca de 121  $\mu m$  a 484  $\mu m$ , según las diferentes fases en que se subdividió este estadio, y la posición central del núcleo, observado con la solución Serrá (Fig. 10). En el estadio de maduración final, además del diámetro del folículo (de 484 a 565  $\mu m$ , con una media de 505  $\mu m$ ), los criterios utilizados fueron el inicio del aclaramiento natural del folículo, provocado por la protólisis del vitelo y, en sus etapas intermedia y final, la presencia visible de una gota lipídica (Fig. 11).

Tabla II. Caracterización de los estadios de madurez gonádica de hembras de *C. undecimalis* en preparaciones histológicas permanentes y en fresco.

| Estadio de madurez       | Características en preparaciones histológicas permanentes  | Características en preparaciones histológicas en fresco   |
|--------------------------|--|---|
| Perinucleolo             | Relación núcleo-citoplasma mayor del 50%, citoplasma basófilo, ovocitos de esféricos a poliédricos, nucleolos en la periferia del núcleo. Folículos de 25 a 112 $\mu m$ de diámetro  | Ovocitos translúcidos<br>Diámetros menores a 118 $\mu m$<br>Núcleo grande visible sin solución aclaradora   |
| Alveolo cortical         | Pequeñas vesículas en el citoplasma, rodeando al núcleo, ovocito ovoidal, relación núcleo citoplasma disminuye, presencia de gotas lipídicas dispersas en el citoplasma Folículos de 100 a 180 $\mu m$ de diámetro                           | Ovocitos ligeramente opacos<br>< 200 $\mu m$ de diámetro<br>Núcleo aun visible  |
| Vitelogénesis primaria   | Aparición de gránulos de vitelo en la periferia del citoplasma, núcleo central, zona radiada gruesa (5 $\mu m$ ), células foliculares visibles, cuerpos lipídicos en la periferia del núcleo, rango del diámetro folicular = 161-212 $\mu m$ | Folículos opacos con apariencia granulosa y núcleo central, visible sólo con solución Serrá<br>Diámetro del folículo de 121-282 $\mu m$ , con media de 171 $\mu m$  |
| Vitelogénesis secundaria | Citoplasma casi cubierto de gránulos de vitelo, mayor presencia de vacuolas color blanco (lipídicas), la zona radiada mide entre 5 y 6 $\mu m$ . Folículos con diámetros de 222 a 373 $\mu m$  | Folículos opacos con apariencia granulosa y núcleo central, visible sólo con solución Serrá<br>Diámetro del folículo de 292-353 $\mu m$ con media de 257 $\mu m$  |
| Vitelogénesis terciaria  | Citoplasma cubierto en su totalidad de gránulos de vitelo y vesículas lipídicas, núcleo en posición central con 74 $\mu m$ de diámetro. Folículos con diámetros de 252 a 383 $\mu m$   | Folículos opacos con apariencia granulosa y núcleo central, visible sólo con solución Serrá<br>Diámetro del folículo de 353-474 $\mu m$ con media de 396 $\mu m$  |
| Maduración final         | Migración del núcleo, fusión de las gotas lipídicas y fusión y transformación (proteólisis) de los glóbulos vitelinos, diámetros del folículo de 303 a 393 $\mu m$   | Paulatino aclaramiento del citoplasma, citoplasma granuloso, el núcleo se vuelve ligeramente visible. Presencia de una gota lipídica, diámetros de 434 a 565 $\mu m$ , con media de 486 $\mu m$   |
| Ovulación (hidratación)  | Ovocito amorfo, se aprecia solo el citoplasma como una película de forma irregular teñida de rosa  | Citoplasma ligeramente opaco y reticular para después llegar a ser translucido, observándose sólo la gota lipídica. La apariencia de los ovocitos al contacto unos con otros va de esférica a hexagonal<br>Diámetros de 550 a 800 $\mu m$ |

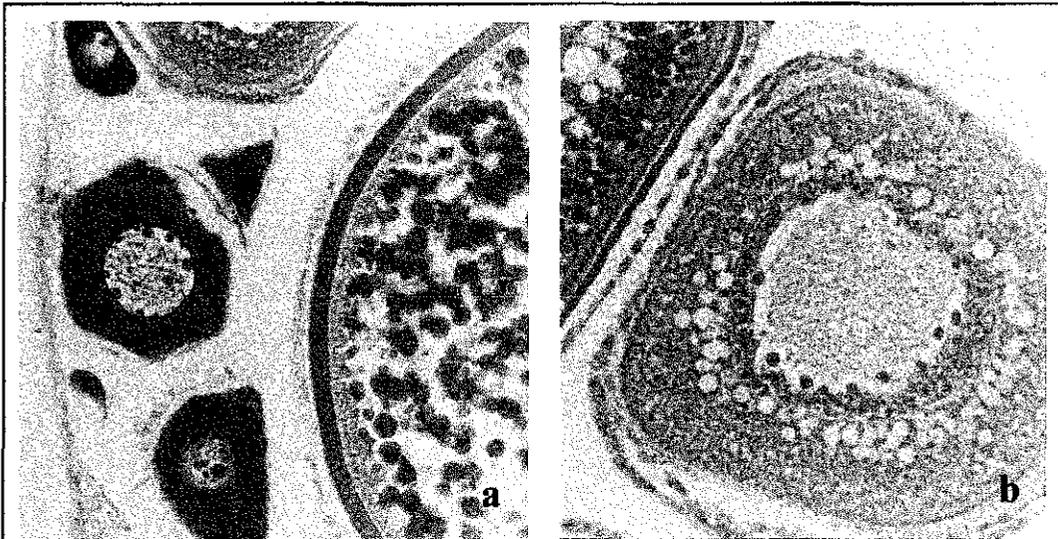


Fig. 5. Microfotografías de preparaciones histológicas permanentes de los estadios de perinucleolo (a) y alveolo cortical (b) de *C. undecimalis*. Tinción con H-E. Aumento 40X.

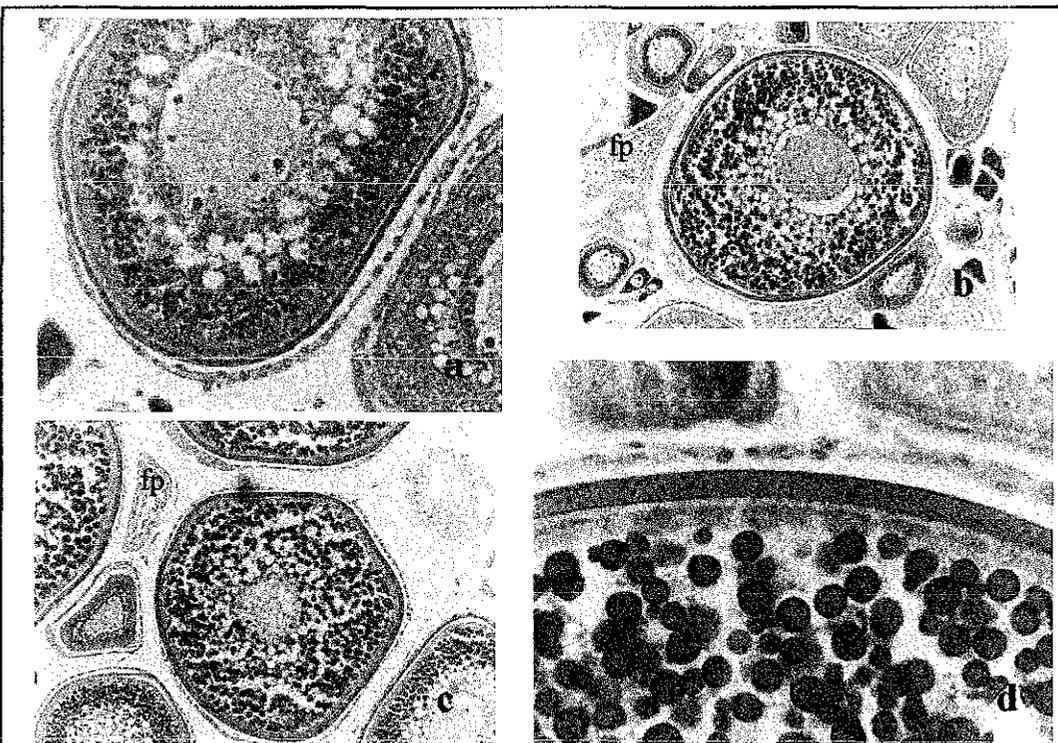


Fig. 6. Microfotografías de preparaciones histológicas del estadio de vitelogénesis en sus fases primaria (a), secundaria (b) y terciaria (c) de gónadas de *C. undecimalis*. En (d) se muestra un acercamiento a la periferia del folículo. En (b) y (c), se observan folículos postovulatorios (fp), indicando desove previo. Tinción con H-E. a) 40X; b y c) 10X y d) 100X.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

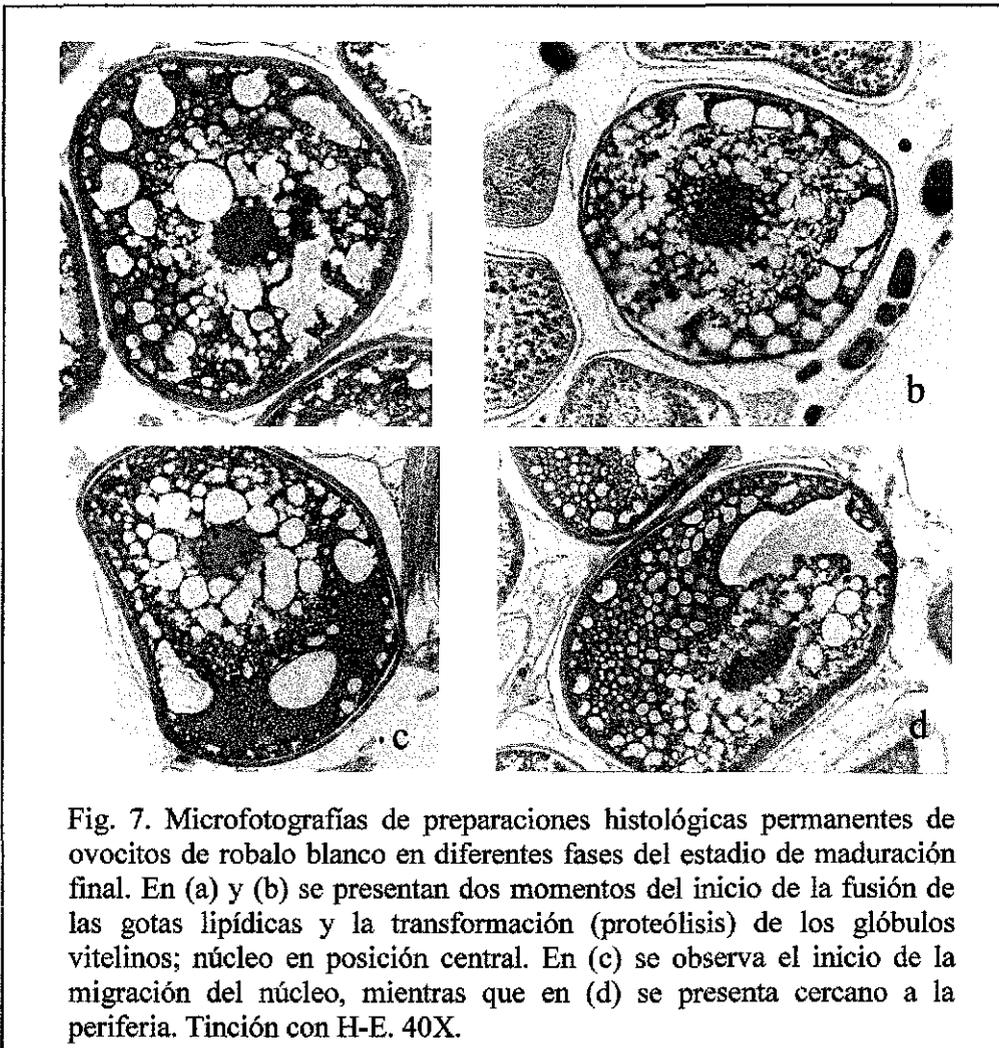


Fig. 7. Microfotografías de preparaciones histológicas permanentes de ovocitos de robalo blanco en diferentes fases del estadio de maduración final. En (a) y (b) se presentan dos momentos del inicio de la fusión de las gotas lipídicas y la transformación (proteólisis) de los glóbulos vitelinos; núcleo en posición central. En (c) se observa el inicio de la migración del núcleo, mientras que en (d) se presenta cercano a la periferia. Tinción con H-E. 40X.

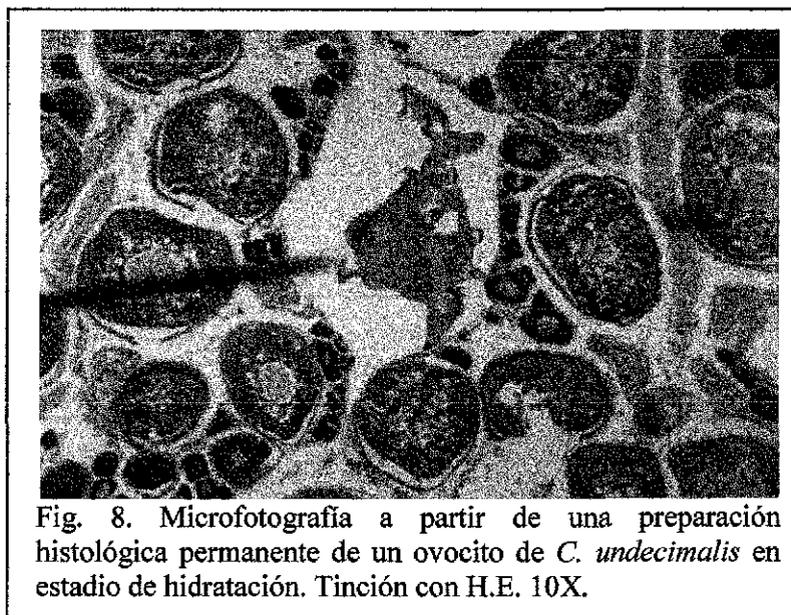


Fig. 8. Microfotografía a partir de una preparación histológica permanente de un ovocito de *C. undecimalis* en estadio de hidratación. Tinción con H.E. 10X.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

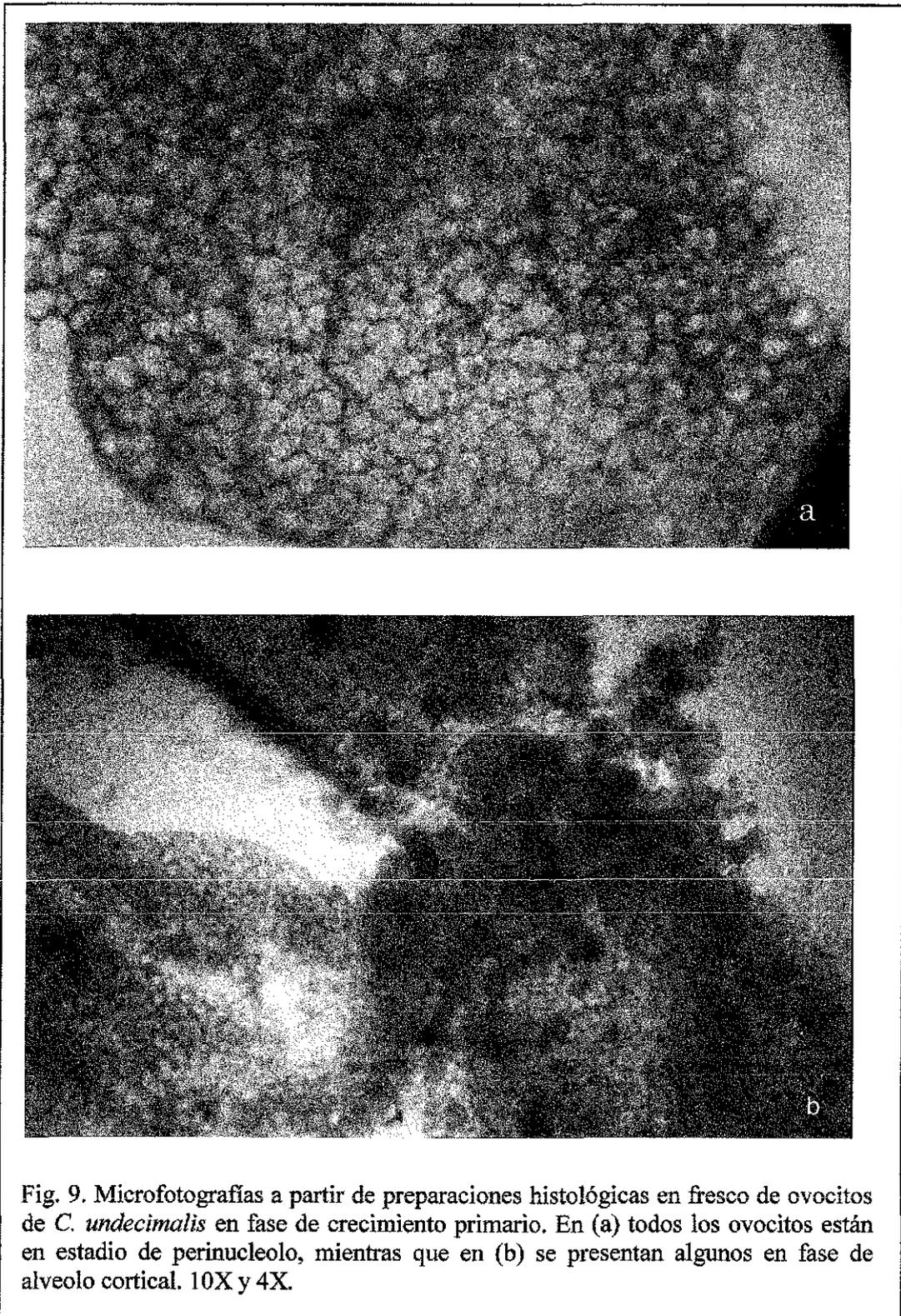


Fig. 9. Microfotografías a partir de preparaciones histológicas en fresco de ovocitos de *C. undecimalis* en fase de crecimiento primario. En (a) todos los ovocitos están en estadio de perinucleolo, mientras que en (b) se presentan algunos en fase de alveolo cortical. 10X y 4X.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

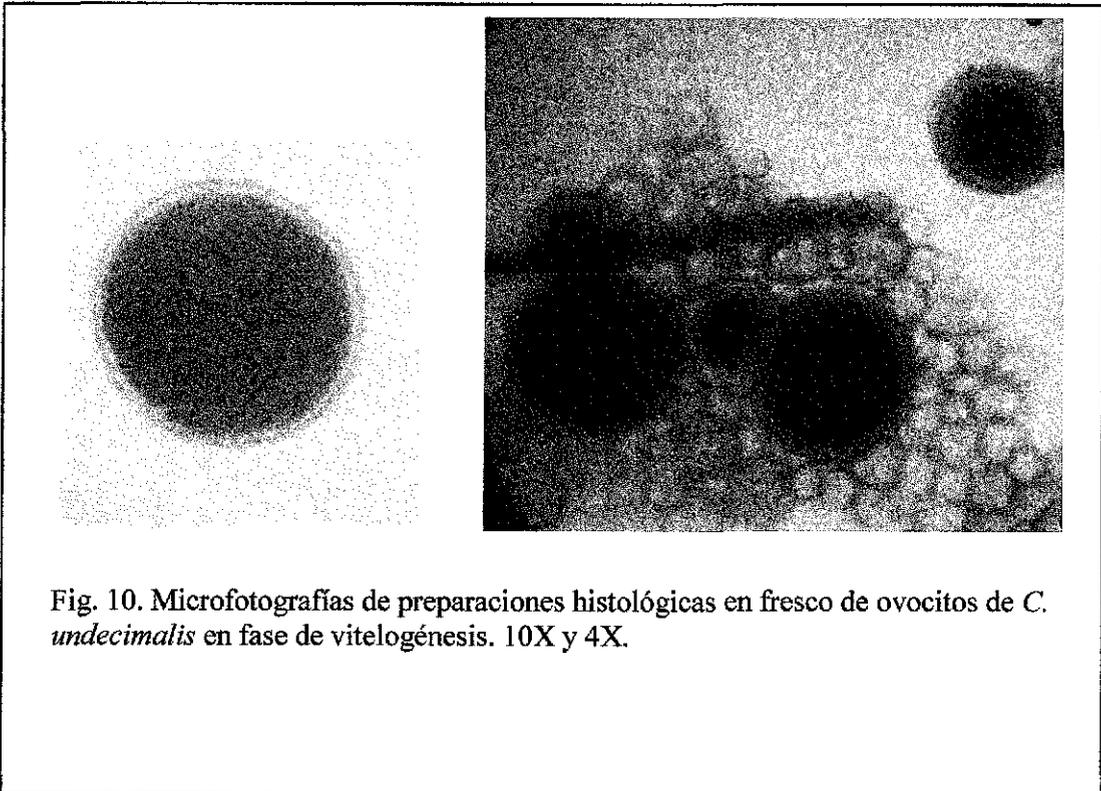


Fig. 10. Microfotografías de preparaciones histológicas en fresco de ovocitos de *C. undecimalis* en fase de vitelogénesis. 10X y 4X.

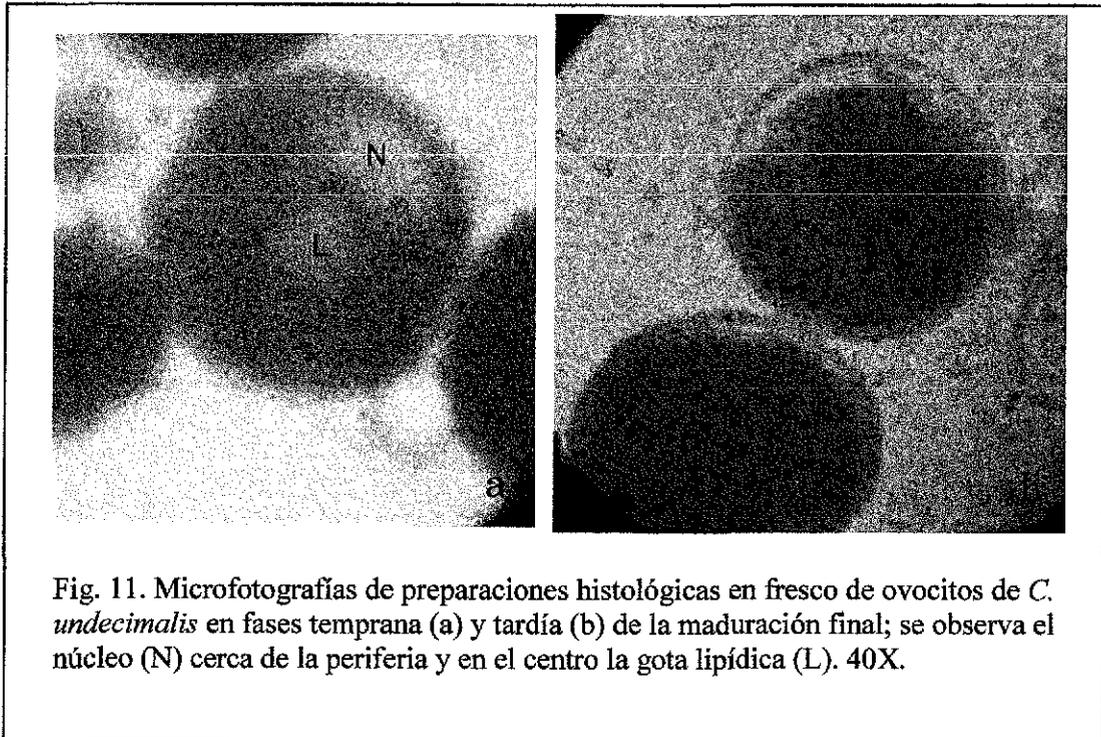


Fig. 11. Microfotografías de preparaciones histológicas en fresco de ovocitos de *C. undecimalis* en fases temprana (a) y tardía (b) de la maduración final; se observa el núcleo (N) cerca de la periferia y en el centro la gota lipídica (L). 40X.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

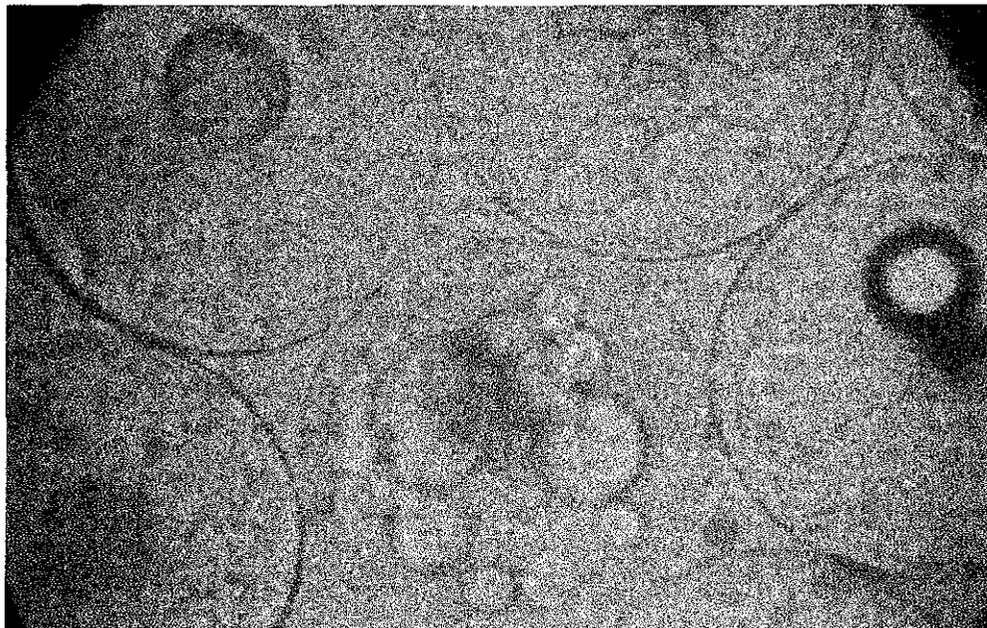


Fig. 12. Microfotografía de una preparación histológica en fresco de ovocitos de *C. undecimalis* en fase temprana de hidratación. Obsérvese la apariencia reticulada del citoplasma. 10 X.

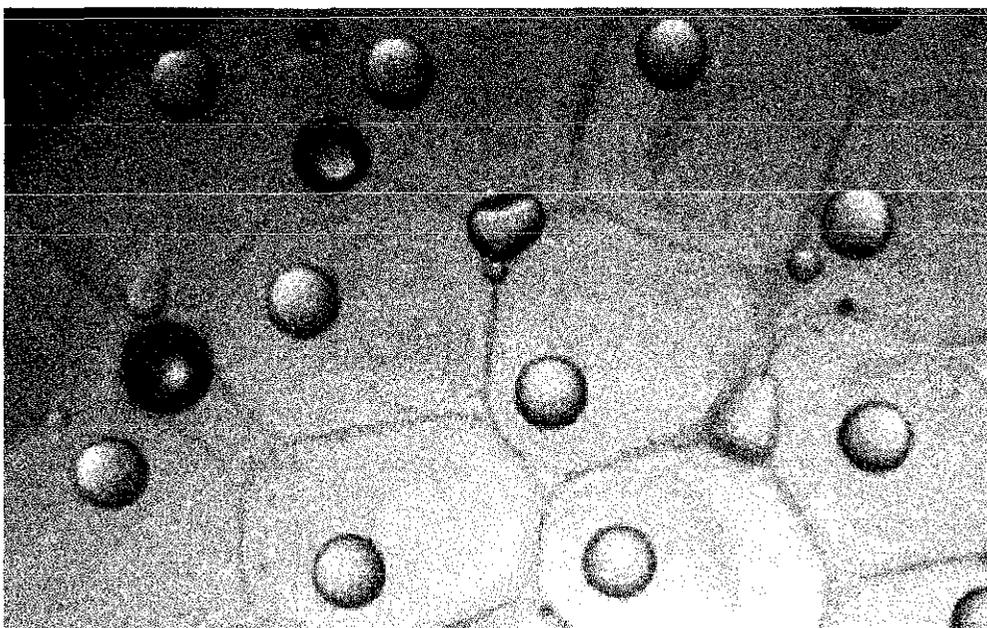


Fig. 13 Microfotografía de una preparación histológica en fresco de ovocitos de *C. undecimalis* en fase final de hidratación (ovulación). 10 X.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En el estadio de ovulación los criterios utilizados fueron: en la fase inicial, la presencia de un citoplasma reticulado y ligeramente opaco (Fig. 12) y la forma completamente esférica de los ovocitos al estar en contacto unos con otros. En la fase final, el citoplasma llega a aclararse por completo observándose únicamente la gota lipídica embebida en el interior del ovocito. Además, los ovocitos adquieren una forma hexagonal al estar en contacto unos con otros. El intervalo de tamaño de los ovocitos durante este estadio es de  $646 \mu m$  hasta un diámetro ligeramente mayor a las  $800 \mu m$  (Fig. 13).

Los criterios anteriores para cada una de las fases propuestas fueron utilizados para la determinación de la madurez gonádica de hembras de robalo blanco en el transcurso de los ensayos de inducción al desove. La utilización de estos criterios fue satisfactoria.

## V.2. Temporada de Reproducción del Robalo Blanco

La temporada de reproducción del robalo blanco de las costas de Campeche es continua durante los meses de mayo a septiembre. Durante este periodo, los valores del IGS calculados para hembras y los diámetros máximo promedio de los ovocitos, determinados en preparaciones histológicas en fresco, permanecieron por arriba del 1 % (con un máximo de 2.85 %) y  $445 \mu m$ , (con un máximo de  $562 \mu m$ ), respectivamente (Fig. 14). Asimismo, el análisis de las preparaciones histológicas permanentes de las gónadas confirma que durante estos meses se encontraron solamente hembras cuyas gónadas estaban en fases de vitelogénesis terciaria, maduración final y ovulación, y la mayoría de estas presentaban folículos postovulatorios (Figs. 6 y 8).

Los valores mínimos de IGS, en concordancia con los valores mínimos en el diámetro máximo promedio de los ovocitos, se presentaron de forma continua durante los meses de noviembre de 1998 a abril de 1999 (Fig. 14), cuando las gónadas están en las fases de crecimiento primario (perinucleolo y alvéolo cortical; Figs. 5a y 5b), indicando una nula actividad reproductiva durante este periodo.

El análisis de correlación entre los valores del IGS y de los diámetros máximos promedio de los ovocitos, con un índice de 0.87, indica que existe una buena correlación entre ellos, por lo

que estos indicadores pueden ayudar a identificar la temporada de reproducción del robalo blanco en las costas de Campeche.

Se determinó que el desarrollo de la gónada del robalo blanco es del tipo sincrónico por grupos ya que se observan hasta tres grupos (Fig. 15), en diferentes estadios de madurez, de ovocitos sincrónicos en hembras próximas al desove (estadio de ovulación). Durante todo el año se presentan ovocitos en fase de crecimiento primario (previtelogénicos) y durante la temporada de reproducción representan el “pool” a partir del cual son reclutados para formar el lote de ovocitos vitelogénicos.

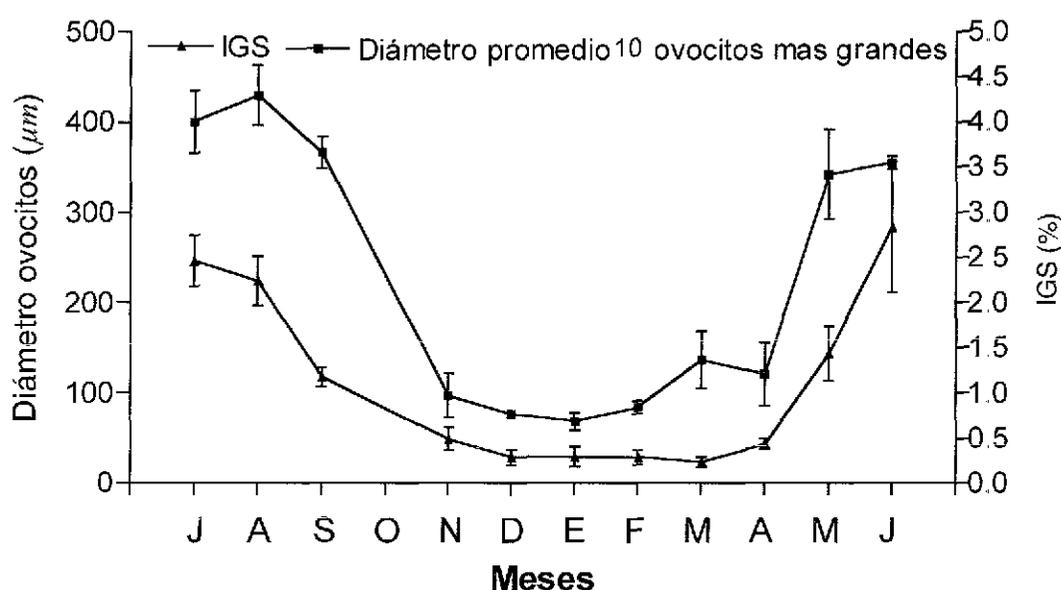


Fig. 14. Variación estacional en el Índice Gonadosomático en hembras y diámetros máximos promedio de ovocitos de robalo *C. undecimalis* durante el ciclo anual de julio de 1998 a junio de 1999. Media  $\pm$  error estándar.

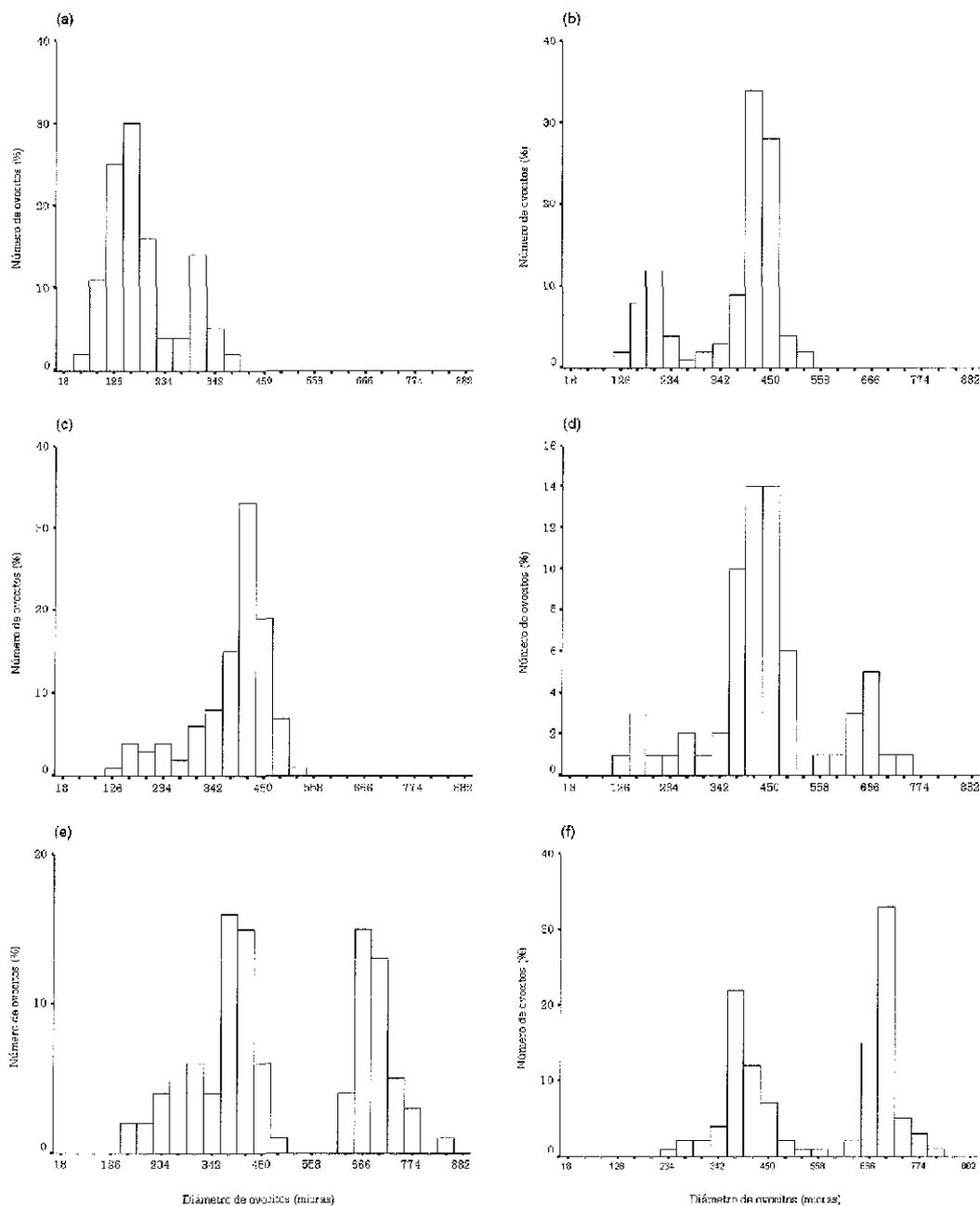


Fig. 15 (a-f). Diagramas de frecuencia del diámetro de ovocitos determinados en preparaciones histológicas en fresco. Se muestran los resultados de seis gónadas representativas. En gónadas previtelogénicas (a), los ovocitos se presentan en un solo lote de diámetros homogéneos; (b) gónada en vitelogénesis primaria y secundaria. Se observa el inicio de la separación de dos lotes de ovocitos; (c) la separación en dos lotes de ovocitos vitelogénicos se hace más evidente; (d) el lote o grupo de ovocitos más adelantados inicia la maduración final (inicio de la hidratación), mientras el menos avanzado entra a la vitelogénesis terciaria; (e y f) en ambas gráficas se observa que los lotes avanzados están próximos a la ovulación, la cual se presenta cuando los ovocitos alcanzan los  $780 \mu\text{m}$  en promedio. En todas las figuras, excepto la (a), no se incluyeron ovocitos menores de  $100\text{-}120 \mu\text{m}$  (b, c, y d) y  $200 \mu\text{m}$  (f).

### V.3. Efecto Crónico de la Hormona LHRHa en el Comportamiento Reproductivo del Robalo Blanco Mediante la Aplicación de Implantes.

#### V.3.1. Parámetros físico-químicos

Los valores promedio mensual de temperatura y salinidad registrados durante los tres ensayos no mostraron diferencias significativas (Anova, p. 0.05) entre tratamientos ni entre el mismo mes de años diferentes. Debido a lo anterior, los valores mensuales en los diferentes ensayos fueron agrupados por mes y se presentan en las figuras 16 y 17.

La temperatura registró valores promedio mínimos durante enero con 23.9°C y máximos en junio con 30.6 °C. Los valores mínimo y máximo diarios se registraron en diciembre y agosto y fueron de 21.2 °C y 33 °C.

Temperaturas promedio arriba de 27 °C se registraron durante los meses de mayo a octubre (Fig. 16). Este valor de referencia corresponde a la temperatura mínima reportada para la reproducción natural del robalo blanco.

Por su parte, la salinidad promedio mensual mínima y máxima se registró en los meses de diciembre y mayo con 25.3 ‰ y 40.4 ‰, respectivamente (Fig. 17). En lo que respecta al valor mínimo diario, éste fue de 23 ‰ y se registró en diciembre, mientras que el máximo fue de 40 ‰ y se registró durante el mes de mayo.

La concentración de oxígeno disuelto se mantuvo siempre por arriba de 3.26 mg/l y se registraron valores de hasta 9.09 mg/l. La concentración promedio de oxígeno disuelto de todos los ensayos fue de  $5.97 \pm .0597$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

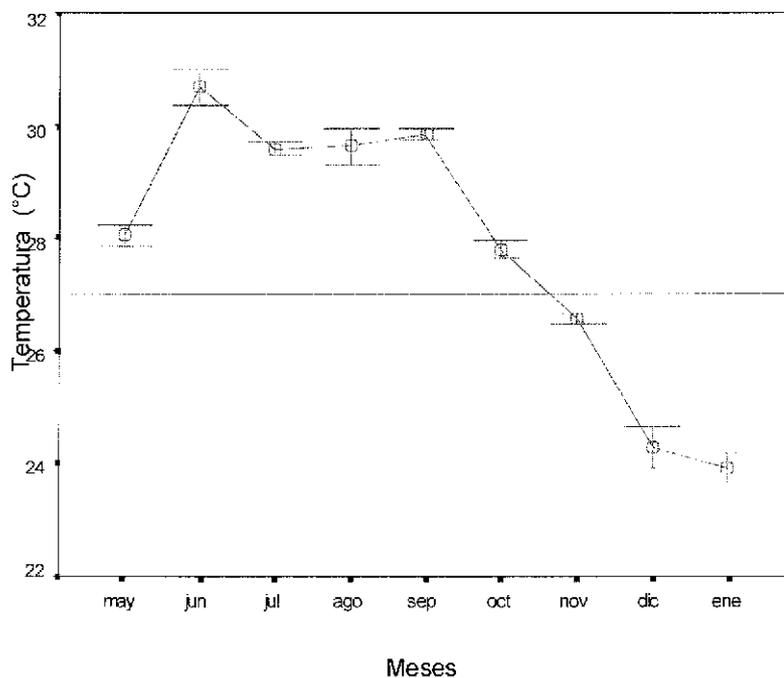


Fig. 16. Valores promedio mensuales de temperatura durante los ensayos. La línea de referencia a los 27 °C representa la temperatura mínima a la cual se ha reportado la reproducción natural del robalo blanco. Debido a que no hubo diferencias significativas por mes/ensayo, los valores mensuales se agruparon en uno solo. (media  $\pm$  error estándar).

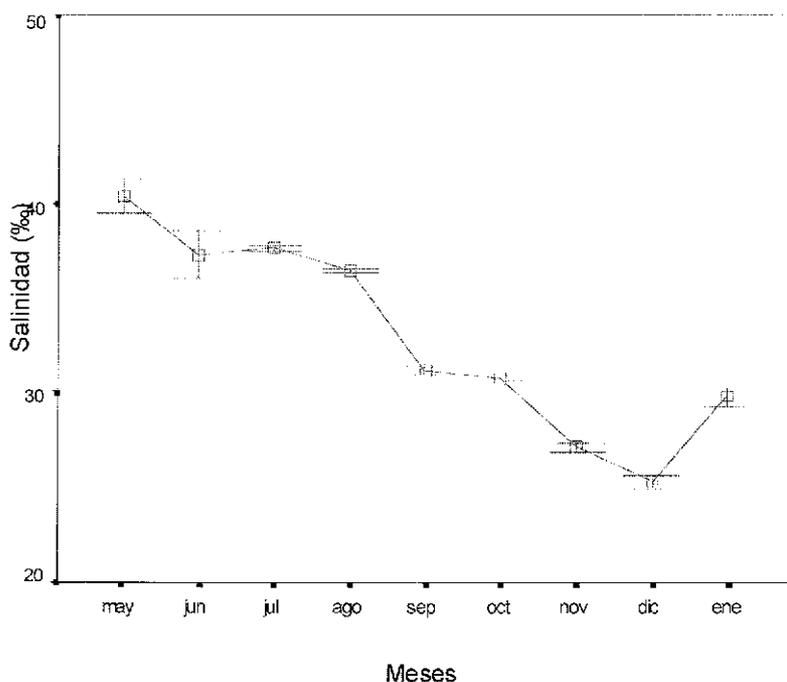


Fig. 17. Valores promedio mensuales de salinidad durante los ensayos. Debido a que no hubo diferencias significativas por mes/ensayo, los valores mensuales se agruparon en uno solo. (media  $\pm$  error estándar).

### V.3.2. Primer ensayo

La aplicación de implantes conteniendo LHRHa a dosis de 50 y 100  $\mu\text{g/pellet/mes}$  no tuvo ningún efecto en promover el avance de la madurez gonádica de *C. undecimalis*. Durante las valoraciones mensuales llevadas a cabo en el transcurso de este primer ensayo, no se encontraron indicadores de maduración gonádica en ninguno de los peces; no hubo una respuesta positiva al estímulo manual y no se logró introducir la cánula a ningún organismo, tampoco se notó inflamación, distensión o coloración del gonoporo.

El sacrificio de un organismo por tratamiento nos corroboró lo anterior. En la figura 18 se presenta una imagen de una preparación histológica, con tinción de Hematoxilina-Eosina (H-E), de la gónada de un pez sacrificado al término de este experimento. Se observa que la gónada se encuentra en estadio previtelogénico, con presencia de ovocitos en estadio perinuclear y de alvéolo cortical (ovocitos  $< 100 \mu\text{m}$ ).

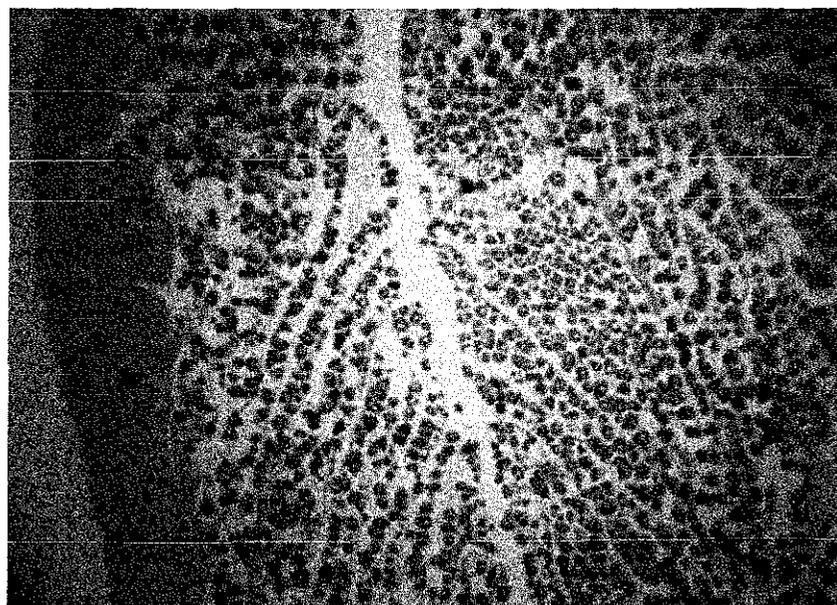


Fig. 18. Microfotografía de una gónada de robalo blanco sacrificado al término del primer ensayo. Ovocitos en estadios perinuclear y de alvéolo cortical. 4X. Tinción H-E.

Sin embargo, el estado fisiológico de los organismos, desde el punto de vista del incremento en peso y longitud obtenidos al término del ensayo, fue favorable. En la Tabla III se presentan los pesos y longitudes promedio al inicio y final. Como puede observarse hubo un incremento promedio en peso y longitud de 990 gr y 7.3 cm, respectivamente, para el tratamiento de 50  $\mu\text{g/pellet/mes}$  y de 510 gr y tres cm, respectivamente, para el de 100  $\mu\text{g/pellet/mes}$ . Es importante hacer notar que no se registraron incrementos durante los dos y tres primeros meses de ensayo en organismos de los tratamientos de 50  $\mu\text{g/pellet/mes}$  y 100  $\mu\text{g/pellet/mes}$ , respectivamente (Fig. 19).

Tabla III. Peso y longitud promedio inicial y final de los organismos experimentales durante el primer ensayo (media  $\pm$  error estándar).

| Tratamiento       | Peso promedio(g) |                | Longitud promedio(cm) |                  | N  |
|-------------------|------------------|----------------|-----------------------|------------------|----|
|                   | Inicial          | Final          | Inicial               | Final            |    |
| 50 $\mu\text{g}$  | 1980             | 2970 $\pm$ 173 | 67.2 $\pm$ 2.0        | 72.05 $\pm$ 1.45 | 10 |
| 100 $\mu\text{g}$ | 1900             | 2410 $\pm$ 194 | 65.2 $\pm$ 1.8        | 68.25 $\pm$ 1.71 | 10 |

Lo anterior quizá se debió a que el efecto del estrés, asociado a los procedimientos de captura y manipulación de los organismos, fue de tal magnitud que alteró significativamente la ingesta de alimento de los organismos, provocando pérdida de apetito de hasta una semana posterior al muestreo en estos primeros meses. En los muestreos subsecuentes, el tiempo de "autoinanición" producto del estrés se redujo a dos o tres días post-muestreo. Esto último se logró al realizar modificaciones a la técnica de muestreo originalmente planteada.

Aunado a lo anterior, durante los tres ensayos realizados, incluyendo los periodos entre ensayos, se observó que esta especie se alimenta de forma variable e inconsistente. Es decir, había días que los peces se alimentaban de forma abundante (se les proporcionaba a saciedad), y otros días, sin motivo aparente, no comían o comían en menor cantidad.

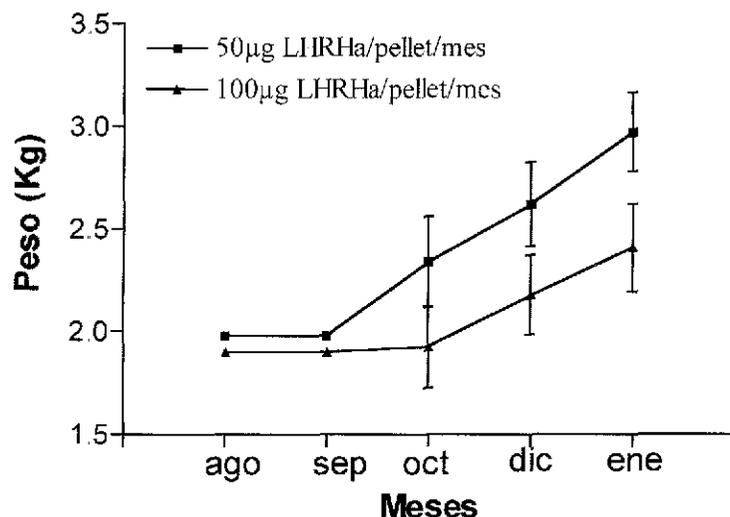


Fig. 19. Peso promedio de los organismos de *C. undecimalis* durante el primer ensayo con implantes IM de LHRHa a concentraciones de 50 y 100  $\mu\text{g}$ . Media  $\pm$  error estándar.

### V.3.2. Segundo ensayo

En la Tabla IV se presentan las tallas promedio al inicio y al final del segundo ensayo. Los resultados del crecimiento promedio mensual por tratamiento (Fig. 20) indican que desde el primer mes del ensayo, los organismos tuvieron un crecimiento constante en peso a diferencia de lo obtenido en los primeros meses del primer ensayo.

Tabla IV. Peso y longitud promedio inicial y final de los organismos experimentales en el segundo ensayo (media  $\pm$  error estándar).

| Tratamiento       | Peso promedio(g) |                | Longitud promedio(cm) |                  | N |
|-------------------|------------------|----------------|-----------------------|------------------|---|
|                   | Inicial          | Final          | Inicial               | Final            |   |
| 200 $\mu\text{g}$ | 2500 $\pm$ 145   | 3170 $\pm$ 150 | 70.92 $\pm$ 2.0       | 74.12 $\pm$ 1.47 | 8 |
| 300 $\mu\text{g}$ | 3600 $\pm$ 211   | 4040 $\pm$ 210 | 77.07 $\pm$           | 80.16 $\pm$ 1.06 | 8 |

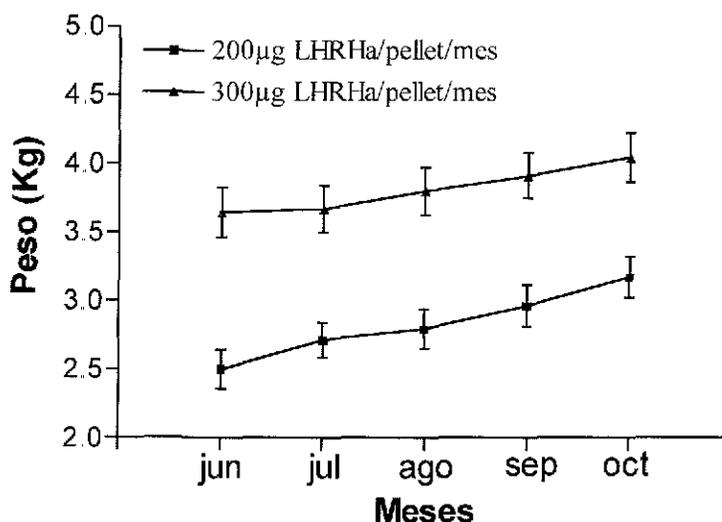


Fig. 20. Peso promedio de los organismos de *C. undecimalis* durante el segundo ensayo con implantes IM de LHRHa a concentraciones de 200 y 300  $\mu\text{g}$ . Media  $\pm$  error estándar.

En el transcurso de este segundo ensayo (realizado en la época de reproducción natural de la especie: mayo-septiembre) sólo una hembra alcanzó el estadio de vitelogénesis pero no logró avanzar al estadio de maduración final. Esta hembra pertenecía al grupo de peces tratados con dosis de 300  $\mu\text{g/pellet/mes}$ , mientras que en el grupo de peces del tratamiento de 200  $\mu\text{g/pellet/mes}$ , ninguno presentó avances en su madurez gonádica.

El estadio de desarrollo gonadal de dicha hembra fue inicialmente determinado, mediante la observación en fresco de los ovocitos, como vitelogénesis terciaria (Tabla II), ya que el diámetro máximo de los ovocitos fue de 400  $\mu\text{m}$  (Fig. 10). La determinación de esta fase se corroboró posteriormente mediante el análisis de una preparación histológica teñida con H-E de una muestra de estos ovocitos (Fig. 21). El peso y longitud de este organismo fue de 3.8 Kg y 78 cm.

Esta hembra fue separada y colocada individualmente en un tanque, con agua de mar, de 1000 litros de capacidad y se tomaron muestras ováricas los días 2, 4 y 5 posterior al implante, para observar la evolución de la maduración de los ovocitos. Sin embargo, al quinto día de observación, los ovocitos permanecían con el mismo diámetro y ningún signo de avance en la

madurez gonádica, por lo que se decidió regresarla al estanque con el resto de los organismos para continuar el experimento.

Durante el muestreo del cuarto implante (septiembre), la hembra que el mes anterior tenía ovocitos de  $400\ \mu\text{m}$  fue revisada mediante canulación y sólo se detectaron ovocitos de aproximadamente  $100\ \mu\text{m}$  de diámetro. Se sacrificó esta hembra para valorar macroscópicamente y microscópicamente la gónada. Se descartó que hubiera desovado voluntariamente entre el tercero y el cuarto muestreo ya que periódicamente se filtraba agua del estanque en una malla de  $100\ \mu\text{m}$  y no se detectaron huevos, por lo que se concluyó que había reabsorbido la gónada. El análisis histológico de la gónada confirmó lo anterior, ya que sólo se observaron ovocitos en fase de crecimiento primario.

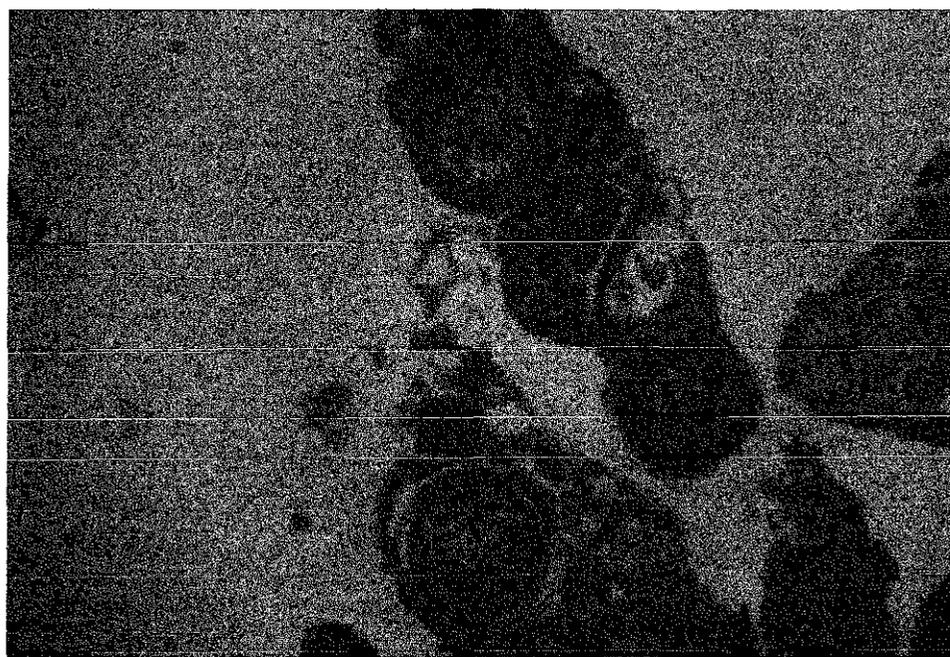


Fig. 21. Microfotografía de una muestra de ovocitos obtenidos a partir de una biopsia ovárica al momento del implante con pellet conteniendo  $300\ \mu\text{g/pellet/mes}$  de LHRHa. Ovocitos vitelogénicos. 10X. Tinción con H.E.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### V.4.Efecto Agudo de las Hormonas LHRHa y Gonadotropina Coriónica Humana en la Inducción al Desove del Robalo Blanco Mediante Inyecciones Intramusculares

##### V.4.1. Tercer ensayo

Al término del tercer ensayo, el promedio en peso registró sólo ligeros incrementos (Tabla V) siendo estos de 200 y 130 g para los tratamientos con GCH y LHRHa, respectivamente. Sin embargo, fluctuaciones mensuales en el peso individual de los organismos caracterizaron el desarrollo de este ensayo. En la figura 22 se presentan los incrementos individuales de tres organismos del tratamiento con GCH y uno del tratamiento con LHRHa. Se aprecia que, a excepción de un organismo del tratamiento con GCH, hay una disminución en el peso individual de los organismos durante el segundo y tercer mes del ensayo, para posteriormente recuperar el peso perdido.

Tabla V. Peso y longitud promedio inicial y final de los organismos experimentales durante el tercer ensayo (media).

| Tratamiento | Peso promedio (g) |       | Longitud promedio(cm) |       | N |
|-------------|-------------------|-------|-----------------------|-------|---|
|             | Inicial           | Final | Inicial               | Final |   |
| GCH         | 3533              | 3727  | 77.2                  | 78.2  | 9 |
| LHRHa       | 3813              | 3947  | 77.7                  | 79.3  | 9 |

Durante el mes de mayo de 2000 se inició la valoración de la madurez gonádica de los organismos con el tratamiento de LHRHa. Debido a que ninguno presentó signos de avance en la madurez gonádica (vitelogénesis), se decidió posponer la primera valoración de los organismos del tratamiento con GCH para el mes de junio. Posterior a la primera evaluación en el mes de mayo, se detectó la presencia de un parásito externo en la totalidad de los organismos del tratamiento con LHRHa. El parásito fue identificado como *Caligus spp.* A raíz de esta infección los organismos dejaron de alimentarse con la regularidad que estaban

teniendo. Se decidió darles tratamiento el día correspondiente al muestreo del mes de junio. El tratamiento utilizado, con éxito, fue un baño en agua dulce y verde de malaquita + formol.

En el muestreo del mes de junio se detectó un ligero avance en la madurez gonádica de dos hembras en el tratamiento de GCH, al presentar ovocitos en inicio de vitelogénesis (aprox. 250  $\mu\text{m}$  de diámetro). Los organismos restantes de este tratamiento y los del LHRHa presentaron ovocitos menores a 100  $\mu\text{m}$ .

En los muestreos del mes de julio, tres hembras del tratamiento de GCH y una del tratamiento de LHRHa se encontraron en fase de vitelogénesis intermedia o avanzada, con diámetros máximos entre los 300 y 400  $\mu\text{m}$  (Tabla VI). Las cuatro hembras fueron inyectadas con la hormona y dosis correspondiente a su tratamiento (500 UI/Kg de GCH ó 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de LHRHa). Las tres hembras del tratamiento con GCH respondieron favorablemente a la aplicación de esta hormona. La gónada de estos peces se vio estimulada a continuar la vitelogénesis, la maduración final y ovulación. Sin embargo, la hembra inyectada con LHRHa fue revisada los días 2, 3 y 5 posterior a la aplicación de la inyección y no se observó ningún avance en la madurez gonádica. Cabe hacer mención que esta hembra, en el muestreo del mes anterior, fue registrada como macho en transición.

El tiempo al cual se detectó la fase de ovulación fue de 36 h. y 41 h., en dos de las tres hembras del tratamiento de GCH (Tabla VI). La cclosión ocurrió a las 18-20 hrs. posterior a la fertilización. La tercera hembra desovó de manera espontánea inmediatamente después de revisarla. En este caso no fue posible llevar a cabo la fertilización de los huevos.

En el mes de agosto se detectó sólo una hembra, en el tratamiento de GCH, en fase de vitelogénesis con ovocitos con diámetros máximos de 460  $\mu\text{m}$ , misma que en el mes anterior ya había sido inducida al desove. Posterior a la inyección de esta hembra con GCH, se siguió la evolución de la madurez final hasta la ovulación y desove mediante masaje en el abdomen. Sin embargo, el momento de la ovulación no se pudo determinar con precisión y posiblemente se forzó el desove (la hembra estaba sub ó sobre madura) ya que solo se logró una tasa de



fertilización mínima (se obtuvieron sólo cuatro larvas). En el tratamiento de LHRHa no se detectó ninguna hembra madura durante este mes.

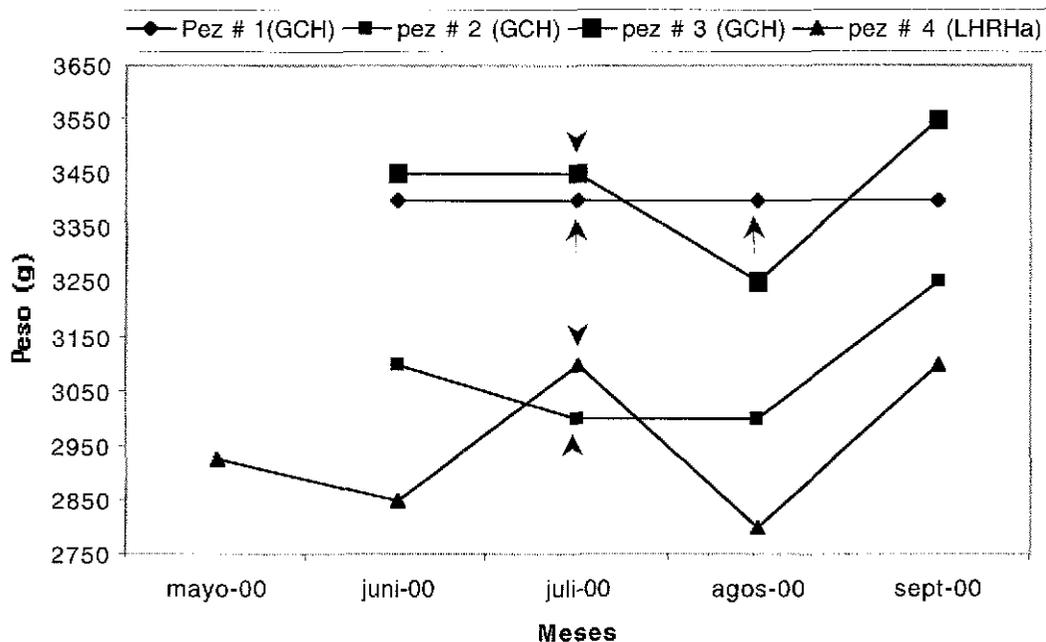


Fig. 22. Variaciones individuales mensuales en el peso de hembras que alcanzaron el estadio de vitelogénesis. Tres hembras en el tratamiento de GCH y una en el de LHRHa. Las flechas indican el momento de la inyección.

Tabla VI. Longitud furcal, diámetro máximo de los ovocitos durante los meses de junio, julio y agosto y tiempo a la ovulación de hembras vitelogénicas inyectadas con GCH y LHRHa.

| # de pez | tratamiento | longitud furcal (cm) | diámetro máximo de ovocitos ( $\mu\text{m}$ ) | diámetro máximo de ovocitos ( $\mu\text{m}$ ) | diámetro máximo de ovocitos ( $\mu\text{m}$ ) | ovulación (horas post-inyección) |
|----------|-------------|----------------------|---|---|---|----------------------------------|
|          |             |                      | junio   | julio   | agosto  |                                  |
| 1        | GCH         | 70                   | 100   | 400   | 400-460                                       | 36                               |
| 2        | GCH         | 66                   | 240   | 300   | < 100   | ***                              |
| 3        | GCH         | 71                   | 250   | 400   | < 100   | 41                               |
| 4        | LHRHa       | 67                   | **  | 400   | < 100   | *                                |

\*Hembra no ovuló; \*\*Macho en transición; \*\*\* desove espontáneo

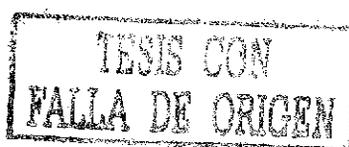
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VI. DISCUSIÓN

En los teleósteos, como en los demás grupos de vertebrados, la mayoría de los eventos encaminados a la reproducción están bajo control neuroendocrino del eje cerebro-hipotálamo-pituitaria-gónada. El cerebro recibe información de las variaciones ambientales, principalmente la longitud del día y la noche (fotoperíodo) y la temperatura a través de la glándula pineal. Una vez procesada la información y si las condiciones son propicias para la actividad reproductiva, se inicia toda una cascada de señales hormonales de y hacia el hipotálamo (GnRH y/o dopamina), pituitaria (gonadotropinas) y gónadas (esteroides), las cuales tienen por objeto regular las diferentes etapas del proceso reproductivo.

Las variaciones ambientales recibidas y procesadas en el cerebro se traducen en última instancia en la definición de una temporada de reproducción o ciclo reproductivo anual. El conocimiento de los factores ambientales asociados a la reproducción y la temporada misma son requisitos indispensables para garantizar el control de la reproducción natural o inducida en condiciones de cautiverio. Este trabajo fue llevado a cabo bajo condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura presentes en la zona de estudio, por lo que, al no ser el objetivo de estudio la manipulación del fotoperíodo y la temperatura, se determinó previamente la temporada de reproducción natural de *C. undecimalis* mediante muestreos mensuales de campo y reportes previos, tanto de poblaciones de la localidad como de otras regiones.

Para la valoración y determinación del estado reproductivo del robalo y en general en peces, se han utilizado diversos indicadores como: una escala empírica basada en observaciones macroscópicas de la gónada (Carvajal, 1975), índice gonadosomático (IGS) (Carvajal, 1975; Caballero *et al.*, 1997; Osorio y González, 1986; Tucker y Campbell, 1988), retrocálculo a partir de la edad, en el momento de la captura en el medio natural, de crías o juveniles (Gilmore *et al.*, 1983; Aliaume *et al.*, 2000), diámetro de los ovocitos (Carvajal, 1975; Tucker y Campbell, 1988 y Taylor *et al.*, 1998) y determinación en plasma de niveles de esteroides sexuales (testosterona, 11-cetotestosterona y estradiol-17 $\beta$ ) y vitelogenina (Roberts *et al.*, 1999). La histología de las gónadas se ha utilizado en la mayor parte de estos estudios como una forma de comprobar el verdadero estado reproductivo de los organismos.



El análisis de las preparaciones histológicas permanentes, los valores del índice gonadosomático (mayores de 1 %) y la evolución del diámetro máximo promedio de los ovocitos durante un ciclo anual, indican que la temporada de madurez gonádica natural de hembras de *C. undecimalis* en el área de Ciudad del Carmen se presentó en junio (ya que en julio, mes de inicio de los muestreos ya se encontraron organismos maduros) y concluyó en septiembre de 1998 (temporada de lluvias en la zona de estudio) e inició, en el siguiente ciclo en mayo de 1999 (Fig. 14).

Estos resultados validan el uso del diámetro máximo de los ovocitos como un método para determinar el estado de madurez sexual en poblaciones de robalo blanco de la Laguna de Términos. El uso del diámetro máximo de los ovocitos da la posibilidad de no sacrificar a los organismos y al mismo tiempo de reducir las posibilidades de un enmascaramiento por factores como desoves previos y talla de los organismos.

La temporada de reproducción del robalo blanco determinada en este estudio está en concordancia con la reportada por diversos autores, quienes indican que se inicia generalmente durante los meses de abril o mayo y concluye durante septiembre u octubre. Caballero *et al.* (1997) reportan que la temporada pico de reproducción en la sonda de Campeche, abarca el período de mayo a septiembre, aunque puede reproducirse todo el año. Asimismo, Carvajal (1975), para la misma zona y Aliaume *et al.* (2000), para varias localidades de Puerto Rico, reportan los meses de mayo-octubre como los de máxima actividad reproductiva. En Venezuela, Osorio y González (1986) reportan el período de abril a septiembre con picos de actividad en mayo y septiembre. Igualmente, en ambas poblaciones de las costas de Florida, la temporada reproductiva del robalo inicia en abril o mayo y es continua hasta los meses de septiembre u octubre (Taylor *et al.*, 1998). Sin embargo, en una población de robalo de las costas Cubanas, el periodo de reproducción es disimilar a los anteriores ya que Álvarez-Lajonchere *et al.* (1982) establecen un periodo de agosto a enero con picos en agosto-septiembre y octubre-diciembre.

La determinación de la temporada reproductiva del robalo blanco en diferentes zonas a lo largo de su distribución natural se ha llevado a cabo con diferentes metodologías. Sin



embargo, las variaciones encontradas dentro de una misma localidad corresponden más a variaciones anuales en los parámetros ambientales que al método mismo. Lo anterior se demuestra en este estudio, ya que durante el primer año los primeros organismos en estado avanzado de madurez aparecieron en julio, mientras que en el segundo año, se encontraron en mayo. Taylor *et al.* (1998) mencionan que el ciclo reproductivo anual del robalo está confinado a periodos en que la longitud del día y la temperatura son máximas.

Por otra parte, variaciones en aspectos reproductivos como tamaño o edad a la primera madurez y épocas de reproducción en poblaciones de diferentes localidades pueden atribuirse también a diferencias en el pool génico, tal como lo demuestran Tringali y Bert (1996) y Tringali *et al.* (1999b) en poblaciones de robalo de ambas costas de la Florida. Esto último podría ser la explicación más evidente para las diferencias tan marcadas reportadas para la población de robalo de Tunas de Zaza, Cuba, que son las que muestran un desfase muy significativo en cuanto a la temporada de reproducción.

Los estudios de Tringali y colaboradores (1996 y 1999b) deberían de prevenir, para no asumir como válidos para las poblaciones locales, los resultados obtenidos en poblaciones distantes, es decir, se debe utilizar con cautela o solo como referencia los resultados obtenidos en otras latitudes, hasta no asegurarse que son aplicables a las poblaciones que se estén estudiando.

El desarrollo de la gónada del robalo blanco se determinó que es del tipo sincrónico por grupos ya que se observaron hasta tres grupos de ovocitos sincrónicos en hembras próximas al desove (estadio de ovulación) (Fig. 8). En este sentido, estos resultados confirman lo reportado por Tucker y Campbell (1988) y Taylor *et al.* (1998) en poblaciones de robalo blanco de la Florida, E.U. y se contraponen a lo reportado por Wallace *et al.* (1993) y Osorio y González (1986) en el sentido de que estos autores determinan el desarrollo de gónadas de robalo como asincrónico. A este respecto, Taylor *et al.* (1998) hacen hincapié en que al momento de la determinación del tipo de desarrollo se debe tomar en cuenta la ocurrencia de ritmos circadianos, presentes poco antes de ocurrir el desove.

Organismos con desarrollo ovárico sincrónico por grupo presentan varios desoves durante la temporada de reproducción (que generalmente es corta en las especies que presentan este tipo de desarrollo). Taylor *et al.* (1998) encuentran que *C. undecimalis* desova a intervalos de 1.1 a 2.5 días, lo cual indica que el reclutamiento en los lotes (clutch) de ovocitos en estadios de vitelogénesis terciaria a ovulación y de vitelogénesis primaria o secundaria a vitelogénesis terciaria es rápido. Este reclutamiento que demuestra el tipo de desarrollo sincrónico por grupo que presenta el robalo puede observarse en la Fig. 15.

La caracterización del desarrollo gonádico en preparaciones histológicas permanentes permitió la identificación de siete estadios, acorde a los criterios de Yamamoto y Yamazaki (1961), Yamamoto y Yoshioka (1964) y Wallace y Selman (1981): perinucléolo, alvéolo cortical, vitelogénesis primaria, vitelogénesis secundaria, vitelogénesis terciaria, maduración final y ovulación (Tabla II). La caracterización de los diferentes estadios no muestra marcadas diferencias con la presentada en otros peces marinos. Sin embargo, esta caracterización permitió correlacionar e identificar estos estadios en las preparaciones de ovocitos en fresco.

La correlación entre ambas preparaciones tuvo por objeto definir criterios de identificación para muestras de preparaciones en fresco obtenidas mediante biopsias ováricas. La identificación precisa del estadio de desarrollo de los ovocitos es requerida fundamentalmente para definir los momentos críticos dentro del protocolo de inducción al desove. Estos momentos son: a) tiempo adecuado de la aplicación de la hormona; y b) momento adecuado para llevar a cabo el desove de forma manual.

Tomando en cuenta lo anterior y por cuestiones prácticas en cuanto a su uso en acuicultura, se decidió agrupar en uno solo a los dos primeros estadios determinados en las preparaciones histológicas en fresco. Así, gónadas con ovocitos de translúcidos a ligeramente opacos, núcleo visible sin el uso de la solución aclaradora y con diámetros hasta de 200  $\mu\text{m}$  son denominadas en este trabajo como estadio previtelogénico.

Este agrupamiento también tiene sustento desde un punto de vista endocrinológico, ya que las gonadotropinas FSH y LH no están involucradas aparentemente en los procesos que anteceden



a la vitelogénesis (Nagahama *et al.*, 1995; Redding y Patiño, 1993). Hembras en estadio previtelogénico, por lo tanto, pueden no ser susceptibles de inducir las a la maduración mediante manipulación hormonal.

El estadio de vitelogénesis es iniciado y estimulado por la secreción de la gonadotropina FSH y se caracteriza por un rápido crecimiento en el tamaño de los ovocitos, provocado por la incorporación y conversión de vitelogenina hepática a gránulos de vitelo (Nagahama *et al.*, 1995). Esta acumulación hace que los ovocitos adquieran un aspecto granuloso y pierdan la apariencia translúcida presentada en el estadio anterior, lo que hace imposible detectar la presencia del núcleo en las preparaciones en fresco, el cual siempre se mantiene en posición central durante este estadio. Así, a través de cambios en el diámetro de los ovocitos es posible distinguir, en preparaciones en fresco, las tres fases vitelogénicas definidas en las preparaciones permanentes.

Los intervalos en el diámetro de los ovocitos de robalo blanco que definen estas tres fases son: para la vitelogénesis primaria de 121 a 282  $\mu\text{m}$ ; vitelogénesis secundaria de 292 a 353  $\mu\text{m}$  y vitelogénesis terciaria de 353 a 474  $\mu\text{m}$  (Tabla II).

La identificación de gónadas en estadios vitelogénicos es importante desde el punto de vista acuicultural, ya que es a partir de esta fase en que generalmente se induce la maduración y ovulación de los ovocitos mediante la aplicación de hormonas exógenas como la GCH y la LHRHa (Patiño, 1997). Los tratamientos del ensayo tres fueron planteados para llevar a cabo la aplicación de las hormonas a partir de la detección de hembras vitelogénicas. En este sentido, la utilización de los criterios que definen este estadio en preparaciones en fresco (Tabla II) fueron validados favorablemente.

El fin de la vitelogénesis da inicio a la maduración final de los ovocitos (o maduración folicular ovárica de acuerdo con Patiño *et al.*, 2001). La maduración final es un evento caracterizado por la migración de la vesícula germinal o núcleo al polo animal y fisiológicamente representa el reinicio de la meiosis. La maduración final es estimulada por un incremento brusco en la concentración de gonadotropina LH circulante en sangre.



El inicio de esta fase es utilizado comúnmente, en la mayoría de los protocolos de inducción al desove, como el momento de la aplicación de la hormona. Por esto, la caracterización e identificación morfológica de este evento se ha descrito para una gran variedad de peces, principalmente de agua dulce. La técnica comúnmente utilizada para la identificación de este estadio se basa en el aclaramiento del ovocito mediante soluciones aclaradoras (p. Ej. Solución aclaradora YBAG; Rodríguez, 1992a).

Recientemente, Neidig *et al.* (2000a) describen y validan una técnica para identificar los estadios de madurez en ovocitos de *C. undecimalis*, utilizando una preparación a modo de “squash” entre el cubre y el portaobjetos y sin el uso de soluciones aclaradoras. El estadio de maduración final es particularmente subdividido por estos autores en cuatro etapas, basándose en cambios en la posición de la vesícula germinal y aparición de gotas lipídicas y su subsecuente fusión en una sola. La caracterización de estas etapas no incluyó la talla de los ovocitos.

La caracterización de los ovocitos llevada a cabo en este trabajo toma en cuenta, además de los cambios morfológicos con relación a la fusión del vitelo y migración del núcleo, el diámetro de los ovocitos como un criterio útil para la determinación del estadio de madurez final. En el presente estudio se encontró que este estadio se caracteriza por un paulatino aclaramiento del citoplasma, que permite la observación, sin el uso de solución aclaradora, de la migración del núcleo y la presencia, al final del estadio, de una sola gota lipídica. El diámetro promedio del ovocito es de 486  $\mu\text{m}$  (Fig. 11 y Tabla II).

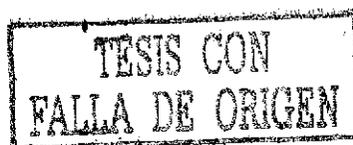
Comparativamente, tanto la técnica descrita por Neidig *et al.* (2000a) y la desarrollada en este trabajo son muy similares y fáciles de realizar y solo requieren de un mínimo de práctica, además de que no precisan la utilización de soluciones químicas, a diferencia de las técnicas que utilizan soluciones aclaradoras. Lo anterior se debe a que en la mayoría de los ovocitos de peces marinos se lleva a cabo, durante esta etapa, un proceso de hidratación, que junto con la fusión por separado del vitelo lipídico y proteínico, ocasiona ese aclaramiento paulatino del citoplasma, lo cual hace visible el núcleo y las gotas lipídicas.

El siguiente evento caracterizado en el transcurso del desarrollo de la ovogénesis de *C. undecimalis* es la ovulación. Es la fase final del desarrollo normal del óvulo y también depende del nivel en plasma de las gonadotropinas. La identificación precisa de la ocurrencia de este estadio dará elementos para predecir el momento o tiempo de desove. En especies en las que no se presenta el desove espontáneo es determinante predecir este evento y llevar a cabo el desove de forma manual. En el caso del robalo blanco no se reporta que ocurra la sincronización en cautiverio entre el desove espontáneo y la liberación de esperma. Sin embargo, uno de los cinco desoves que se obtuvieron ocurrió de forma espontánea, fuera del agua, al momento de la revisión de la hembra.

Para el caso específico del robalo blanco, se requiere de una predicción del momento de la ovulación, ya que el período máximo entre este acontecimiento y el inicio del deterioro de la calidad del huevo (sobremaduración del huevo) es de solo 15 a 30 minutos (Rottmann *et al.*, 1991b). Es decir, que solo se cuenta con un lapso pequeño para detectar la ovulación, proceder inmediatamente al desove manual y posteriormente llevar a cabo la fertilización artificial. En contraste con la trucha arco-iris, este periodo es de siete días (Rottmann *et al.*, 1991b).

Generalmente, los tiempos de ovulación que se manejan en la literatura son aquellos contados a partir de la aplicación de la hormona, ya sea en implantes o en inyecciones. Sin embargo, estos son muy variables y solo deben tomarse como una guía, ya que dependen de varios factores, entre los más importantes están: el grado de desarrollo de los ovocitos a la aplicación de la hormona, el tipo de hormona utilizada y la temperatura (Tucker, 1998). Por ello, contar con una caracterización del desarrollo de madurez de los ovocitos permitirá precisar los tiempos particulares del momento de la ovulación, en función de las condiciones particulares presentes.

En suma, se identificó satisfactoriamente el grado de desarrollo gonádico de los organismos bajo tratamiento en muestras obtenidas mediante biopsias ováricas, basándose en la caracterización presentada en la Tabla II. Sin embargo, aún falta precisar los tiempos de ocurrencia entre estadios para predecir con mayor seguridad el momento de la ovulación.



La LHRHa ha sido considerada como la hormona más efectiva para inducir a la maduración y ovulación en muchas especies de peces, principalmente en aquellas consideradas como de difícil reproducción en cautiverio como lenguados (Mugnier *et al.*, 2000; Watanabe *et al.*, 1998), pez leche (Lee *et al.*, 1986b), barramundi (García, 1990), etc.

Sin embargo, durante los ensayos con la LHRHa en este estudio no se observó avance en la madurez gonádica de los reproductores, a excepción de una hembra en el ensayo dos. Lo anterior, a pesar de que los organismos presentaron crecimientos significativos, lo cual no había sido el caso en estudios previos (Henderson-Arzapalo *et al.*, 1988b y CENAIM-JICA, 1995). El hecho de que sólo una hembra haya alcanzado el estadio de vitelogénesis y que ésta no haya continuado su avance a pesar de la aplicación de un nuevo implante, da elementos para suponer que la LHRHa no contribuyó a estimular el desarrollo de este proceso.

A pesar de que los parámetros ambientales no se controlaron, por lo que estuvieron sujetos a las variaciones ambientales, en el transcurso del ensayo dos (y ensayo tres) tanto la temperatura como la salinidad estuvieron dentro de los rangos de ocurrencia de la reproducción reportados para *C. undecimalis* (Fig. 16). En el caso del ensayo uno, los tres primeros meses del ensayo se presentaron valores por arriba de los 27 °C, que es la temperatura mínima de reproducción del robalo blanco (Taylor *et al.*, 2000). Por lo que respecta a la concentración de oxígeno disuelto, esta siempre se mantuvo a niveles aceptables, arriba de los 3.5 mg/l; de esta forma, los parámetros físico-químicos no influyeron negativamente en estos resultados.

La ineficacia de la LHRHa para lograr la estimulación a la maduración en esta especie pudo deberse a que: 1) se hayan proporcionado dosis insuficientes de hormona en los tratamientos; 2) los organismos aún se encontraban en una etapa temprana de su desarrollo (pubertad); 3) los receptores de las células gonadotropas no sean sensibles al estímulo de la LHRHa utilizada y 4) sus efectos fisiológicos fueran atenuados o neutralizados debido a que su ruta de acción es más larga. La LHRHa estimula a la pituitaria para la liberación de gonadotropinas, las que a su vez, deben llegar al folículo para estimular la producción y liberación de estradiol. Esta larga

ruta de acción puede permitir la posibilidad de que el efecto del estrés (posiblemente la cortisona) debido al manejo, por mínimo que éste sea, actúe antes que el estradiol.

Las dosis de LHRHa utilizadas en los diferentes ensayos son similares a las que se han empleado con éxito en otras especies de peces. Por ejemplo, en el pez leche *Chanos chanos*, Lee *et al.* (1986b) logran inducir la madurez gonádica utilizando pellets, conteniendo la misma hormona LHRHa utilizada en este estudio, a concentraciones de 200  $\mu\text{g/pellets}$ . Igualmente, García (1990) logra resultados positivos en un miembro de la familia Centropomidae utilizando concentraciones similares de LHRHa; en este sentido sería interesante probar con dosis mas elevadas o utilizar otro tipo de LHRHa.

Recientemente, Skapura *et al.* (2000) logran inducir la ovulación en hembras de robalo maduras recién capturadas del medio, utilizando implantes de cuatro tipos de LHRHa. Los tipos de LHRHa con los que tuvieron resultados positivos son los equivalentes a las formas nativas que se presentan en *C. undecimalis* y son: sbLHRH, cLHRHa-II y sLHRHa, mientras que con la mLHRHa los resultados fueron negativos. El protocolo de inducción utilizado consistió en la aplicación de implantes diarios hasta alcanzar la ovulación (durante cinco días, inclusive). La LHRHa utilizada en el presente estudio no corresponde a ningún tipo de las anteriores. Estos resultados sugieren que, en el robalo blanco, los efectos de la aplicación de los diferentes tipos de LHRHa son diferenciales, lo cual apoya el punto tres mencionado líneas arriba.

El periodo de transición entre el estadio juvenil inmaduro y el adulto maduro reproductivamente (pubertad), determinado generalmente como la edad o talla a la primera madurez sexual, no está bien definido para las diferentes poblaciones de robalo. Taylor *et al.* (2000) reportan tallas mínimas de primera madurez de 50 y 45 cm de longitud para las costas Este y Oeste de la Florida, respectivamente. En la sonda de Campeche se deberían esperar tallas menores de primera madurez si se considera que está en función, primeramente, de la temperatura (Setzler *et al.*, 1980, citado en Holland *et al.*, 2000), sin embargo, el único antecedente para la población de robalo de la sonda de Campeche se sitúa por arriba de esas tallas, siendo ésta de 70 cm de longitud patrón (Caballero *et al.*, 1997).

Si se consideran válidas estas tallas, se explicarían en parte los resultados obtenidos en los ensayos uno y dos, ya que se inició con organismos en un intervalo de 57 a 78 cm de longitud, en el primer caso y de 70.9 a 77 cm, en el segundo. Es decir, la mayoría de los organismos bajo tratamiento apenas se encontraban en su primer ciclo reproductivo. Estudios en el pargo rayado (*Morone saxatilis*) y otras especies de peces han demostrado que la adquisición completa de la madurez gonádica puede requerir más de un ciclo reproductivo (Holland *et al.*, 2000).

Lo anterior se hace aún más confuso con la reciente documentación del estado de protandria que presenta esta especie (Taylor *et al.*, 2000), ya que es claro que la talla de primera madurez de las hembras será ligeramente mayor que la talla de inversión sexual. Las tallas de inversión sexual registradas por estos autores, en organismos mantenidos en cautiverio, van de los 41.7 cm a los 63.2 cm. En nuestro estudio se registraron dos casos de reversión sexual en organismos con tallas de 72 cm y 83.5 cm de longitud furcal (con pesos de 2850 gr y 4100 gr, respectivamente). De lo anterior, se desprende que es necesario un estudio más completo para determinar con mayor precisión los valores de estos parámetros biológicos en la población de robalo blanco de la sonda de Campeche.

El punto cuatro es apoyado por los resultados de Haddy y Pankhurst (1999), quienes demuestran en la brema negra que el estrés ejerce un rápido efecto de inhibición sobre la esteroidogénesis gonadal, con disminuciones significativas en la concentración de testosterona y estradiol en el transcurso de la primera hora post estrés. Así, es probable que los efectos de la LHRHa, la cual actúa a un nivel superior del eje endocrinológico, se vean atenuados o neutralizados debido a que su ruta de acción es más larga.

El robalo blanco es una de las especies de peces en las que se han documentado los efectos negativos, al nivel de actividad reproductiva, provocados por el estrés de la captura y mantenimiento en cautiverio. Wallace *et al.* (1993) encuentran que los ovarios de *C. undecimalis* comienzan a degenerarse 48 horas después de la captura, producto de un “inusual traumatismo” por el estrés de captura, transporte y manejo de los organismos.

Asimismo, Henderson-Arzapalo *et al.* (1988b) reportan pérdida de apetito y alimentación errática en organismos en cautiverio, lo que provocó que después de varios meses de ensayo, el peso final de los organismos fuera menor que el inicial. Situación similar ocurrió en ensayos sobre robalo blanco en Ecuador (CENAIM-JICA, 1995). En ninguno de estos trabajos se logró la maduración de los reproductores.

Igualmente sucedió durante los dos primeros meses de ensayo en nuestras condiciones iniciales de manejo (Fig. 16). El nulo crecimiento observado en los organismos en este periodo fue debido a que la mayoría de los organismos reiniciaba su alimentación de siete a diez días posteriores a los muestreos. Esta situación fue revertida a partir del tercer mes de muestreo, siendo factores importantes para esto, el refinamiento en la metodología de muestreo y posiblemente la aclimatación paulatina de los organismos a las condiciones de cautiverio y manejo.

En este sentido, se ha demostrado en varias especies de peces que los efectos del estrés inhiben la reproducción a diferentes niveles del eje endocrinológico, desde el desarrollo de los gametos hasta el subsecuente desarrollo y sobrevivencia larval, aunque los mecanismos fisiológicos para esta inhibición aún no han sido determinados (Hobby *et al.*, 2000). En términos generales, Pankhurst y Van der Kraak (1997) apuntan que el estrés afecta los niveles plasmáticos de gonadotropinas y algunos esteroides gonadales, sin embargo, diferentes estudios muestran resultados contrastantes del efecto del estrés sobre los indicadores reproductivos, dependiendo del tipo de estresor, especie utilizada y tratamiento experimental.

Por ejemplo, estrés de confinamiento en *Salmo trutta* resultó en incrementos de GtH en plasma, mientras que la respuesta al estrés de captura y transporte de *Catostomus commersoni* resultó en una disminución de GtH a niveles indetectables después de 24 horas de su captura (Pickering *et al.*, 1987, Stacey *et al.*, 1984 y Sumpter *et al.*, 1987, citados en Pankhurst y Van Der Kraak, 1997). Asimismo, estrés de tipo crónico o agudo resultan en una disminución en los niveles plasmáticos de andrógenos (testosterona y 11-cetotestosterona) y/o estrógenos (17 $\beta$ -estradiol) en la mayoría de las especies de peces estudiadas (Pankhurst y Van Der Kraak,

1997), sin embargo, los esteroides que participan en la maduración final del ovocito ( $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one y el  $17\alpha,20\beta$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one) no se han visto afectados negativamente por estresores que han provocado disminución en plasma de otros esteroides gonadales (Carragher y Pankhurst, 1991).

Pankhurst y Van der Kraak (1997) sugieren que este efecto diferencial puede deberse a respuestas fisiológicas específicas de cada una de las especies, a diferencias generadas por el tipo de estresor ó a diferencias provocadas por el uso de organismos silvestres o recién capturados.

Aunque no se han llevado a cabo estudios específicos sobre los efectos del estrés en el robalo blanco, es claro, por los resultados encontrados por otros autores y el presente estudio, que el estrés de captura, confinamiento y manejo inhiben algunas rutas endocrinológicas relacionadas con la reproducción, específicamente al nivel de secreción de gonadotropinas y/o esteroides gonadales, principalmente el estradiol.

Así, estos resultados sugieren que, bajo las condiciones de este trabajo, la aplicación de la LHRHa en las modalidades de implante (e inyecciones, ensayo tres) no tiene efectos significativos para estimular la vitelogénesis en el robalo blanco como se ha reportado para otras especies (Lee *et al.*, 1986b), incluso de la familia Centropomidae (García, 1990). Los resultados de este estudio coinciden con lo reportado en el robalo blanco por Henderson-Arzapalo *et al.* (1988b) utilizando LHRHa +  $17\alpha$  metiltestosterona y CENAIM-JICA (1995) únicamente LHRHa.

Los resultados también muestran que estos efectos pueden ser minimizados mediante mejoras en las técnicas de manejo, un largo periodo de aclimatación de los reproductores a condiciones de cautiverio y un mínimo manejo de los reproductores antes y durante la temporada reproductiva. En la brema negra *Acanthopagrus butcheri*, especie que también ha sido catalogada como extremadamente sensible al estrés, Haddy y Pankhurst (1999) sugieren reducir al máximo el estrés para la obtención de desoves en cautiverio.

Así, los resultados anteriores dieron sustento para considerar que se podrían obtener de forma natural organismos en estadio de vitelogénesis, como sucedió en el único organismo que alcanzó esta fase en el segundo ensayo. Asimismo, se decidió probar, además, con la GCH, hormona utilizada para inducir la ovulación en hembras maduras de robalo recién capturadas del medio natural.

El planteamiento anterior dio buenos resultados ya que se logró obtener de forma natural, tres hembras vitelogénicas de siete presentes en el tratamiento con GCH y una en el tratamiento de LHRHa. En este último caso, el hecho de que solo una hembra haya alcanzado la vitelogénesis pudo haberse debido al brote del parásito identificado como *Caligus spp.*

El proceso de vitelogénesis en estos organismos pudo haberse favorecido también por la incorporación en la dieta, previa y durante este último ensayo, de aceite de hígado de bacalao. Se ha demostrado en algunas especies la existencia de un periodo de la gametogénesis sensible a los nutrimentos de la dieta (Burton, 1984, citado en Tyler y Sumpter, 1996). Buddington *et al.* (1987, citado por Tucker, 1998) sugieren que este periodo corresponde al estadio de vitelogénesis temprana, mientras que diversos autores establecen que la inclusión de ácidos grasos, principalmente del tipo  $\omega$ -3, es de particular importancia como nutrimento en la dieta de los reproductores de peces. Chou *et al.* (1993, citado en Tucker, 1998) recomienda adicionar 4 % de aceite de pescado a la dieta de reproductores de la brema marina para aumentar la producción y calidad de los huevos.

La obtención de hembras vitelogénicas sin aplicación de químicos exógenos también ha sido intentada en varias ocasiones en el robalo blanco sin éxito alguno. Colura (1989) lo lleva a cabo en organismos mantenidos en estanques y jaulas y Roberts (1987) y Henderson-Arzapalo *et al.* (1988a) lo intentaron manipulando la temperatura y fotoperiodo.

La aplicación de la hormona LHRHa en la única hembra que alcanzó el estadio de vitelogénesis en este tratamiento, no logró estimular el avance en la madurez de la gónada. De esta forma, la aplicación del tipo de LHRHa utilizada, vía implantes o inyecciones, no fue capaz de acelerar la maduración gonádica de hembras de robalo. Por su parte, la GCH a dosis

de 500 UI/kg de pez, logró estimular la vitelogénesis, maduración final y ovulación en tres hembras vitelogénicas (se obtuvieron dos desoves en una de ellas).

Contrario a la LHRHa, la GCH actúa directamente al nivel de gónada, por lo que su efecto en favorecer la síntesis y secreción de estradiol es inmediata. La GCH es similar en cuanto a sus efectos / funciones que la LH. Esta, al igual que la FSH, se ha visto que es un potente estimulador del esteroide  $17\beta$ -estradiol, el cual actúa al nivel del hígado para inducir la producción de vitelogenina.

Por otra parte, la vitelogénesis es un proceso relativamente largo que puede durar semanas o años, dependiendo de la especie, por ejemplo en el caso del esturión puede ser de 1 a 2 años (Conte *et al.*, 1988, citado por Tucker, 1998). En el caso de especies muy sensibles al manejo es deseable que la aplicación de hormonas no esté confinada a un momento o periodo corto de tiempo (como el estadio de maduración final) debido a los riesgos de regresión gonadal que pueden presentarse en estos organismos producto de los efectos del estrés de manejo (Wallace *et al.*, 1993).

En este sentido, los resultados positivos obtenidos en el ensayo tres representan una ventaja respecto a lo que se reporta en la mayoría de los organismos que tradicionalmente son inducidos al desove. En este ensayo se demuestra, al lograr un total de cuatro desoves en cuatro intentos de inducción con la GCH, que no es necesario esperar a que los organismos alcancen el estadio de madurez final para ser inducidos al desove. El robalo blanco puede ser inducido al desove con GCH a partir de gónadas en estadio de vitelogénesis secundaria.

Estudios *in vitro* muestran que la sensibilidad del ovocito a la GCH incrementa con el tamaño de los mismos y con el grado de migración de la vesícula germinal, siendo más sensibles cuando la migración inició que cuando aún está en posición central (Canario y Scott, 1990). Sin embargo, en este estudio se logró la inducción a la maduración final y desove aplicando la hormona cuando los ovocitos presentaban diámetros máximos de 300 a 400  $\mu m$  (ovocitos en vitelogénesis secundaria y terciaria, respectivamente). Los resultados obtenidos al inyectar a este tamaño de diámetro son alentadores y significativos, ya que en ovocitos de robalo *in vitro*,

Wallace *et al.* (1993) no lograron inducir la maduración final y ovulación con GCH a diámetros menores de 500  $\mu\text{m}$  (ovocitos maduros). Lo anterior sugiere que la GCH *in vivo* fue capaz de inducir y acelerar la síntesis e incorporación de vitelogenina para completar el proceso de vitelogénesis.

Para el caso del robalo blanco esto es importante ya que la manipulación frecuente de organismos maduros puede provocar fácilmente la regresión de la gónada. En este caso, al detectarse un organismo en fase de vitelogénesis (ya sea secundaria o terciaria), puede ser inyectado sin el riesgo de que ocurra la regresión de la gónada por manipulaciones subsecuentes.

Así, combinando los resultados de los tres ensayos, se considera que la disminución de los efectos del estrés producto del manejo, un prolongado periodo de aclimatación al cautiverio, la talla de los organismos y una dieta rica en ácidos grasos (en este caso se utilizó aceite de pescado como complemento alimenticio), son aspectos fundamentales para lograr la vitelogénesis natural en cautiverio, de esta especie.

Desde el punto de vista acuicultural estos resultados son prometedores ya que demuestran que el robalo blanco puede reproducirse en cautiverio, sin embargo, los efectos negativos (inmunoreacciones) que provocaría el uso de GCH en la inducción al desove (Donaldson *et al.*, 1982; Patiño, 1997) y la condición de protandría que presenta esta especie (Taylor *et al.*, 2000), sugieren la importancia de contar con lotes de reproductores que se estén renovando continuamente. Otra solución a este inconveniente sería utilizar otros químicos exógenos que no tengan los efectos secundarios de la GCH y mantengan su efectividad en la inducción a la maduración final y ovulación, como por ejemplo otros análogos de la LHRH.

Los resultados presentados son asimismo importantes en el sentido de que es la primera vez que se documenta la maduración gonádica, seguida de la inducción al desove de hembras de robalo blanco *C. undecimalis* en condiciones de cautiverio. Es claro que estos ensayos deben continuarse hasta lograr la maduración y desove en cautiverio de manera rutinaria, lo que implica intensos estudios y apoyo a la investigación que se realice en esta área.

## VII. CONCLUSIONES

- Se caracterizaron y correlacionaron los estadios de madurez gonádica de hembras de *C. undecimalis* en preparaciones histológicas permanentes y en fresco.
- La caracterización de las preparaciones histológicas en fresco fue validada satisfactoriamente durante las diferentes etapas de la ovogénesis.
- El estadio de ovulación se caracteriza por un aclaramiento paulatino del ovocito y la presencia de solo una gota lipídica. La ocurrencia de este estadio nos indica el momento de llevar a cabo el desove manual.
- El tipo de desarrollo de la gónada de hembras de *C. undecimalis* es sincrónico por grupos.
- El robalo es una especie sensible a la manipulación y al confinamiento en cautiverio, debido a lo cual, debe darse énfasis a una correcta aplicación de las técnicas de manejo.
- En condiciones de cautiverio, las hembras de robalo blanco alcanzan de forma natural la vitelogénesis solo después de un largo periodo de aclimatación y minimizando al máximo el estrés por manejo.
- Bajo las condiciones de este estudio, la aplicación, vía implantes e inyecciones intramusculares de LHRHa no estimula el avance de la madurez gonádica de hembras de robalo blanco.
- La GCH estimuló la vitelogénesis, la maduración final y la ovulación de *C. undecimalis* en cautiverio.
- Las hembras de robalo blanco pueden ser inducidas al desove mediante la aplicación de GCH, a partir de la presencia en la gónada de ovocitos con diámetro de al menos 300  $\mu\text{m}$ .
- Se corrobora la condición de protandría de *C. undecimalis*, recientemente reportada.
- Se documenta por primera vez la maduración natural y reproducción del robalo blanco en condiciones de cautiverio.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Ager, L. A., D. E. Hammond y F. Ware (1976). Artificial spawning of snook. Proceeding of Annual Conference of the Southeast Association of Game Fish Communication, 30: 158-166.
- Aguilar, M.M., B.B. Coutiño y R.P. Salinas (1996). Manual General de Técnicas Histológicas y Citoquímicas. Facultad de Ciencias, UNAM. Méx. 73 pp.
- Aliaume, C., A. Zerbi, J.C. Joyeux y J. M. Miller (2000). Growth of juvenile *Centropomus undecimalis* in a tropical island. *Environmental Biology of Fishes*, 59: 299–308
- Alok, D. y Y. Zohar (2000). One receptor in the pituitary for three GnRHs in the brain: a perciform paradigm. Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on fish endocrinology. July 31-August 3, 2000. University of Washington and Northwest Fisheries Science Center, Seattle, Washington.
- Álvarez-Lajonchere, L., M. Báez-Hidalgo y G. Gotera (1982). Estudio de la biología pesquera del robalo de ley *Centropomus undecimalis* (Bloch) (PISCES:CENTROPOMIDAE) en Tunas de Zaza, Cuba. *Revista de Investigaciones Marinas*, 3(1): 159-177.
- Álvarez-Lajonchere, L. M. y O.G. Hernández-Molejón (1994). Manual de Técnicas para la Producción Piloto de Juveniles de Peces Marinos. Centro de Investigaciones Pesqueras (Cuba)-Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tab. (México). 102 pp.
- Amador del Angel, G. E. M., L. E. Gómez, F. F. Barrera y R. P. Cabrera (1994). Cultivo experimental del robalo *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1729) en estanques de concreto en la isla del Carmen, Campeche, México. *Memorias del II Seminario sobre Peces Nativos con Uso Potencial en Acuicultura*. Cárdenas, Tabasco, México.
- Amano, M., A. Urano y K. Aida (1997). Distribution and function of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the teleost brain. *Zoological Science*, 14: 1-11.
- Breton, B., T. Mikolajczyk, J. M. Danger, F. Gonnet, S. Saint-Pierre y H. Vaudry (1989). Neuropeptide Y (NPY) modulates in vitro gonadotropin release from rainbow trout pituitary glands. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7:77.
- Caballero, C. V., D. L. F. Peña, V. J. F. Echavarría, M. O. Jiménez, J. A. Zamora y R. C. Ro (1997). Contribución al Conocimiento de las épocas de reproducción de la especie robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) Bloch en la zona suroeste oeste del estado de Campeche. Informe final. INP-CRIP-Carmen. Cd. del Carmen, Campeche.
- Canario, A. V. M., y A. P. Scott (1990). Plasma level of ovarian steroids including 17 $\alpha$ -20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one and 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -trihydroxy-5 $\beta$ -pregnane, female dabs

(*Limanda limanda*)- marine flatfish induced to mature and ovulate with human chorionic gonadotropin. *General and Comparative Endocrinology*, 77: 177-191.

- Carragher, J. F. y N. W. Pankhurst (1991). Stress and reproduction in a commercially important marine fish, *Pagrus auratus* (Sparidae). En: Proceeding of the fourth international symposium on reproductive physiology of fish. University of East Anglia, U.K., 7-12 de julio de 1991. Editado por: Scott, A.P., J.P. Sumpter, D.E. Kime y M.S. Rolfe. FishSymp 91, Sheffield. 253-255 pp.
- Carrillo, M. y S. Zanuy (1993). Fisiología de la Reproducción de los Teleósteos. En: Acuicultura Marina: Fundamentos Biológicos y Tecnología de la Producción. Coordinador. F. Castelló, Publicaciones Universidad de Barcelona. Barcelona, España. 125-141 pp.
- Carvajal, R. J. (1975). Contribución al conocimiento de la biología de los robalos *Centropomus undecimalis* y *C. poeyi* en la Laguna de Términos, Campeche, México. Boletín del Instituto Oceanográfico. Universidad de Oriente, 14: 51-70.
- CENAIM-JICA (1995). Final Report of Activities of the Fish Culture Division. August 1990-July 1995. Fish Culture Program. Technical Cooperation Program Ecuador-Japón. Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas "Edgar Arellano M.". Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador. Pags. 46-64.
- Chapman, P. (1976). Annual report for artificial culture of snook. Job. No. 2: Induced spawning & fry culture. State of Florida Game Fresh Water Commission. Tallahassee. 25p.
- Chapman, P., F. Cross, W. Fish y K. Jones (1982). Final report for sportfish introductions project. Study 1: Artificial culture of snook. State of Florida Game Fresh Water Commission. Tallahassee. 36 pp.
- Chávez, H. (1961). Estudio de una nueva especie de robalo del Golfo de México y redescrición de *Centropomus undecimalis* (Bloch) (Pisc., Centropom.). *Ciencia*, 21(2):75-83.
- Chávez, H. (1963). Contribución al conocimiento de la biología de los robalos, chucumite y constantino (*Centropomus spp.*) del estado de Veracruz. (Pisc. Centrop.). *Ciencia*, 22:141-161.
- Chávez, L.M.O., A.E. Mattheeuws y M.H. Pérez (1989). Biología de los Peces del Río San Pedro en Vista de Determinar su Potencial para la Piscicultura. Editado por: INIREB-FUCID, Xalapa, Ver. México. 222 pp.
- Crim, L. W. y B. D. Glebe (1990). Reproduction. En: Methods for Fish Biology. Editado por: C. B. Schreck and P. Moyle. American Fisheries Society U.S.A, 529-553 pp.

- Crim, L. W., J. J. Nestor, Jr. y C. E. Wilson (1988). Studies of the biological activity of LHRH analogs in the rainbow trout, lanlocked salmon, and the winter flounder. *General and Comparative Endocrinology*, 71: 372-382.
- Colura, R. L. (1989). Attempted maturation of snook in ponds and cages. Texas Parks and Wildlife Department Fisheries Division. Management data series No. 2. 15 pp.
- Copeland, P. A. y P. Thomas (1989). Control of gonadotropin release in atlantic croaker: evidence for a lack of dopaminergic inhibition. *General and Comparative Endocrinology*, 74: 474-483.
- Donaldson, E. M. (1973). Reproductive endocrinology of fishes. *American Zoologist*, 13:909-927.
- Donaldson, E. M., G. A. Hunter, G. Van der Kraak y H. M. Dye (1982). Application of LH-RH analogues to the induced final maturation and ovulation of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).
- Fontaine, M. (1976). Hormones and the control of reproduction in aquaculture. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, 33: 922-939.
- Fraser, T. H. (1968). Comparative osteology of the Atlantic snooks (Pisces, *Centropomus*). *Copeia*, 3: 433-460.
- García, L. M. B. (1990). Advancement of sexual maturation and spawning of sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch), using pelleted luteinizing hormone-releasing hormone analogue and 17 $\alpha$ -methyltestosterone. *Aquaculture*, 86: 333-345.
- Gen, K., K. Okuzawa, B. Senthilkumaran, H. Tanaka, S. Moriyama y H. Kahawa (2000). Unique expression of gonadotropin-I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. *Biology of Reproduction*, 63(1): 308-319.
- Gilmore, R. G., C. J. Donahoe y D. W. Cooke (1983). Observations on the distribution and biology of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Florida Scientist*, 46: 313-336.
- Goetz, F. W. (1983). Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation. En: Fish Physiology. Editado por: W. S. Hoar, D. J. Randall y E. M. Donaldson. New York. Capitulo 3.: Vol. IX B.
- Goetz, F. W., A. K. Berndtson y M. Ranjan (1991). Ovulation, mediators at the ovarian level. En: Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications. Editado por: P. K. T. Pang y M. P. Schreelman. San Diego. Capitulo 4: Vol. 4 A.
- Goetz, F. W. y M. Garczynski (1997). The ovarian regulation of ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 17: 33-38.

- Grier, H. (2000). Ovarian epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). *Journal of Morphology*, 204: 265-281.
- Grier, H.J. y R. G. Taylor (1998). Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology*, 53: 521-542.
- Grier, H. J. y F. Lo Nostro (2000). The teleost germinal epithelium: A unifying concept. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. University of Bergen, Bergen, Norway., 4-9 de Julio de 1999. Editado por B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson y S.O. Stefansson. p. 233-236.
- Groves, D. J. y T. F. C. Batten (1986). Direct control of the gonadotroph in a teleost, *Poecilia latipinna*. II: Neuhormones and neurotransmitters. *General and Comparative Endocrinology*, 62: 315-326.
- Guevara, E., A. Bosch, C. Aguilar, R. R. Lalana y J. Beltran (1994). Alimentación natural de tres especies de robalos (Pisces: Centropomidae) en la laguna Guanaroca, Cienfuegos. *Revista de Investigaciones Marinas*, 15(2):119-123.
- Haddy, J. A. y N. W. Pankhurst (1999). Stress-induced changes in concentrations of plasma sex steroids in black bream. *Journal of Fish Biology*, 55: 1304-1316.
- Hassin, S., Y. Gothilf, O. Blaise y Y. Zohar (1998). Gonadotropin-I and -II subunit gene expression of male striped bass (*Morone saxatilis*) after gonadotropin-releasing hormone analogue injection: quantitation using an optimised ribonuclease protection assay. *Biology of Reproduction*, 58: 1233-1240.
- Henderson-Arzapalo, A., R. L. Colura y A. F. Maciorowski (1988a). An evaluation of temperature and photoperiod induced maturation of snook. Texas Parks and Wildlife Department, Coastal Fisheries Branch. Austin Texas Management Data Series Number 143: 15 pp.
- Henderson-Arzapalo, A., R. L. Colura y J. Van Orman (1988b). Effect of LHRHa and testosterone implants on the maturation of snook. Texas Parks and Wildlife Department, Coastal Fisheries Branch. Austin Texas. Management Data Series Number 140: 18 pp.
- Hernández, S. A. (1987). Biología y pesquería del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) (Bloch) en el río San Pedro, Tabasco. Informe Técnico para obtener el título de Ing. Pesq. en Acuicultura. ITMAR. Boca del Río, Ver. 65p.
- Hobby, A. C., N. W. Pankhurst y J. A. Haddy (2000). The effect of short term confinement stress on binding characteristics of sex steroid binding protein (SBP) in female black bream (*Acanthopagrus butcheri*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 125: 85-94.

- Holland, M. C., S. Hassin y Y. Zohar (2000). Gonadal development and plasma steroid level during pubertal development in captive-reared striped bass, *Morone saxatilis*. *Journal of Experimental Zoology*, 286:49-63.
- Howells, R. G., A. J. Sonski, P. L. Shafland y B. D. Hilton (1990). Lower temperature tolerance of snook, *Centropomus undecimalis*. *Northeast Gulf Science*, 11(2): 155-158.
- Idler, D. R. y T. B. Ng (1983). Teleost gonadotropins: isolation, biochemistry and function. En Fish Physiology. Editado por: Hoar, W. S., d. J. Randall y E. M. Donaldson., Academic Press, New York. Vol. IX-A: 187-221.
- Lau, S. R. y P. L. Shafland (1982). Larval development of snook, *Centropomus undecimalis* (Pisces: Centropomidae). *Copeia*, 3: 618-627.
- Lee, C. S., C. S. Tamaru y C. D. Kelley (1986a). Technique for making chronic-release LHRHa and 17 $\alpha$ -methyltestosterone pellets for intramuscular implantation in fishes. *Aquaculture*, 59: 161-168.
- Lee, C. S., C. S. Tamaru, J. E. Banno y C. D. Kelley (1986b). Influence of Chronic administration of LHRH-analogue and/or 17 $\alpha$ -methyltestosterone on maturation in milkfish, *Chanos chanos*. *Aquaculture*, 59: 147-159.
- Lin, X. W., C. J. Otto y R. E. Peter (1998). Evolution of neuroendocrine peptide systems: Gonadotropin-releasing hormone and somatostatin. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 119: 375-388.
- Luczkovich, J. J., S. F. Norton y R. G. Gilmore, Jr. (1995). The influence of oral anatomy on prey selection during the ontogeny of two percoid fishes, *Lagodon rhomboides* and *Centropomus undecimalis*. *Environmental Biology of fishes*. The Hague, 44(1-3): 79-95.
- Marshall, A. R. (1958). A survey of the snook fishery of Florida, with studies of the biology of the principal species, *Centropomus undecimalis* (Bloch). Florida. State Board. Conservation Technical Service. No. 22, 39pp.
- Masui, Y. (1985). Meiotic arrest in animal oocytes. En: Biology of Fertilization. Editado por: Metz, C. B. y A. Monroy. Academic Press, Orlando. Cap. 8.
- McMichael, R. H., Jr., K. M. Peters y G. R. Parsons (1989). Early life history of the snook, *Centropomus undecimalis*, in Tampa Bay, Florida. *Northeast Gulf Science*, 10(2): 113-125.
- Melamed, P., H. Rosenfeld, A. Elizur y Z. Yaron (1998). Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 119: 325-338.

- Mugnier, C., M. Guennoc, E. Lebegue, A. Fostier y B. Breton (2000). Induction and synchronisation of spawning in cultivated turbot (*Scophthalmus maximus* L.) broodstock by implantation of a sustained-release GnRH-a pellet. *Aquaculture*, 181: 241-255.
- Muhlia-Melo, A. F. (1995). Sinopsis de información biológica, pesquera y acuacultural acerca de los robalos del género *Centropomus* en México. (Volumen especial). Editado por: SEMARNAP-CIBNOR-CONACYT. México, D.F. 85 pp.
- Neidig, C. L., D. S. Skapura, H. J. Grier y C. W. Dennis (2000a). Techniques for spawning common snook: broodstock handling, oocyte staging, and egg quality. *Journal North American Aquaculture*, 62(2): 103-113.
- Neidig, C. L., D. S. Skapura, H. J. Grier y J. M. Sprinkel (2000b). Preliminary study - a comparison of doses of human chorionic gonadotropin (HCG) on ovulation, egg quality and larval survival in common snook, *Centropomus undecimalis* [Bloch]. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Bergen, Bergen, Norway, 4-9 de Julio de 1999. Editado por B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson y S.O. Stefansson. p. 429.
- Nagahama, Y. (1983). The functional morphology of the teleost gonad. En: Fish Physiology. New York. 9A: 223-275pp.
- Nagahama, Y. (1987). Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zoological Science*, 4: 209-222.
- Nagahama, Y. y M. Yamashita (1989). Mechanisms of synthesis and action of 17 $\alpha$ -20 $\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a teleost maturation-inducing substance. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7:193.
- Nagahama, Y., M. Yoshikuni, M. Yamashita, T. Tokumoto y Y. Katsu (1995). Regulation of oocyte growth and maturation in fish. En: Current Topics in Developmental Biology, vol. 30: 103-145.
- Osorio, J. L. y L. W. Gonzalez (1986). Aspectos reproductivos del Robalo, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792) (Pisces: Centropomidae) de la Isla de Margarita, Venezuela. *Contribuciones Científicas*. Centro de Investigaciones Científicas. Universidad de Oriente. Porlamar, Venezuela.(No. 9): 36 pp.
- Pankhurst, N. W. y G. Van der Kraak (1997). Effects of stress on reproduction and growth of fish. En: Fish Stress and Health in Aquaculture. Editado por: G.K. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter y C.B. Schreck. Cambridge University Press. Cambridge U.K. Society for Experimental Biology Seminar, Series 62, pp 73-93.
- Patiño, R. (1997). Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals. *The Progressive Fish-Culturist*, 59: 118-128.

- Patiño, R., G. Yoshizaki, P. Thomas y H. Kagawa (2001). Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 129 (2001) 427-439.
- Patiño, R. y P. Thomas (1990). Effects of gonadotropin on ovarian intrafollicular processes during the development of oocyte maturational competence in a teleost, the atlantic croaker: evidence for two distinct stages of gonadotropic control of final oocyte maturation. *Biology of Reproduction*, 43: 818-827.
- Perez-Pinzon, M. A. y P. L. Lutz (1991). Activity related cost of osmoregulation in the juvenile snook (*Centropomus undecimalis*). *Bulletin of Marine Science*, 48(1): 58-66.
- Peter, R.E., C. S. Nahorniak, S. Shih, J. A. King y R. P. Millar (1987). Activity of position-8-substituted analogs of mammalian gonadotropin-releasing hormone (mGnRH) and chicken and lamprey gonadotropin-releasing hormones in goldfish. *General and Comparative Endocrinology*, 68: 385-393.
- Peter, R.E., H.R. Lin, y G. Van Der Kraak (1988). Induced ovulation and spawning of cultured fresh-water fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture*, 74:1-10.
- Peter, R. E., K. L. Yu, T. A. Marchant y P. M. Rosenblum (1990). Direct neural regulation of the teleost adenohypophysis. *Journal of Experimental Zoology*, supplement 4: 84-89.
- Peter, R. E. y K. L. Yu (1997). Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: Basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7(2): 173-197.
- Peters, K. M., S. D. Giordano, J. M. Adams, R. W. Fenwick, R. W. McWilliams y N. J. Berill (1998). Factors Influencing the Distribution of Larvae of the Common Snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch), in Southwest Florida. *Florida Marine Research Publications No. 53*, 33 pp.
- Peterson, M. S. y R. G. Gilmore, Jr. (1988). Hematocrit, osmolality, and ion concentration in fishes: Consideration of circadian patterns in the experimental design. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 121(1): 73-78.
- Peterson, M. S. y R. G. Gilmore, Jr. (1991). Eco-physiology juvenile snook *Centropomus undecimalis* (Bloch): Life-history implications. *Bulletin of Marine Science*, 48(1): 46-57.
- Peterson, M. S., R. E. Brockmeyer, Jr. y D. M. Scheidt (1991). Hypoxia-induced changes in vertical position and activity in juvenile snook, *Centropomus undecimalis*: Its potential role in survival. *Florida Scientist*, 54(3-4): 173-177.
- Potthoff, T. y J. A. Tellock (1993). Osteological development of the snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei, Centropomidae). *Bulletin of Marine Science*, 52(2): 669-716.

- Powell, J. F. F., Y. Zohar, A. Elizur, M. Park, W. H. Fisher, A. G. Craig, J. E. Rivier, D. A. Lovejoy y N. M. Sherwood (1994). Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterised from brains of one species. *Proceeding National Academic Science USA*, 91: 12081-12085.
- Redding, J. M. y R. Patiño (1993). Reproductive Physiology. En: The Physiology of Fishes. Editado por: Evens, D. M. Boca Ratón, CRC Press: 503-533pp.
- Rivas, L. R. (1986). Systematic review of the Perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia*, 3: 579-611.
- Roberts, D. E. Jr. (1987). Induced maturation and spawning of common snook, *Centropomus undecimalis*. *Proceeding of the thirty-eighth annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute*. Trois-islets, Martinique. Editado por: F. Williams. Miami, Florida. 222-230 p.
- Roberts, S. B., L. F. Jackson, W. King V, R. G. Taylor, H. J. Grier y C. V. Sullivan (1999). Annual reproductive cycle of the common snook: Endocrine correlates of maturation. *Transactions of the American Fisheries Society*, 128: 436-445.
- Rodríguez, G. M. (1992a). Evaluación gonádica de parentales para la inducción a la reproducción. En: Temas Actuales sobre Reproducción de Teleósteos. Editado por: Rodríguez, G. M. SEPESCA-UAM. México: p 25-35.
- Rodríguez, G.M. (1992b). Técnicas de Evaluación Cuantitativa de la Madurez Gonádica en Peces. AGT Editor, S.A. México. 79 pp.
- Rottmann, R. W., J. V. Shireman y F. A. Chapman (1991a). Hormonal control of reproduction in fish for induced spawning. SRAC publication No. 424: 4 pp.
- Rottmann, R. W., J. V. Shireman y F. A. Chapman (1991b). Techniques for taking and fertilising the spawn of fish. SRAC publication No. 426: 8 pp.
- Sadovy, Y. y D. Y. Shapiro (1987). Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. *Copeia*, 1: 136-156.
- Selman, K. y R.A. Wallace (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoological Science*, 6: 211-231.
- Shafland, P. L. y D. H. Koehl (1979). Laboratory rearing of the common snook. *Proceeding of the Annual Conference of Southeast Association of Fish and Wild Agencies*, 431(1979).
- Shafland, P. L. y K. J. Foote (1983). A lower lethal temperature for fingerling snook, *Centropomus undecimalis*. *Northeast Gulf Science*, 6(2): 175-177.

- Sherwood, N. M., H. J. Grier, C. Warby, J. Peute y R. G. Taylor (1993). Gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, in snook *Centropomus undecimalis*, in comparison with forms in black sea bass *Centropristis striata*. *Regulatory Peptides*, 46(3): 523-534.
- Somoza, G. M. y R. E. Peter (1991). Effects of serotonin on gonadotropin and growth hormone release from in vitro perfused goldfish pituitary fragments. *General and Comparative Endocrinology*, 82(1): 103-110.
- Skapura, D. P., H. J. Grier, C. L. Neidig, N. M. Sherwood, J. E. Rivier y R. G. Taylor (2000). Induction of ovulation in common snook, *Centropomus undecimalis*, using gonadotropin-releasing hormones. Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of Bergen, Bergen, Norway, 4-9 de Julio de 1999. Editado por B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson y S.O. Stefansson. p. 430.
- Suzuki, K., H. Kawauchi y Y. Nagahama (1988). Isolation and characterisation of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *General and Comparative Endocrinology*, 71: 302-306.
- Swanson, P., K. Susuki, H. Kawauchi y W. W. Dickhoff (1991). Isolation and characterisation of two coho salmon gonadotropins. GtH I and GtH II. *Biology of Reproduction*, 44: 29-38.
- Taylor, R. G., H. J. Grier y J. A. Whittington (1998). Spawning rhythms of common snook in Florida. *Journal of Fish Biology*, 53(3): 502-520.
- Taylor, R. G., J. A. Whittington, H. J. Grier y R. E. Crabtree (2000). Age, growth, maturation, and protandric sex reversal in common snook, *Centropomus undecimalis*, from the east and west coasts of South Florida. *Fisheries Bulletin*, 98(2): 612-624.
- Thouard, E., G. Nédélec y R. Pierson (1994). L'élevage du loup tropical (*Lates calcarifer*, Bloch) en polynésie Française: Techniques d'élevage. Synthèse de neuf années de recherche. Rapport interne de la Direction des Ressources Vivantes de l'IFREMER. Département Ressources Aquocoles Station/Laboratoire, Tahiti. 105 pp.
- Tringali, M. D. y K. M. Leber (1999). Genetic considerations during the experimental and expanded phases of snook stock enhancement. *Bulletin of National Research Institute Aquaculture*, Suppl. 1:109-119
- Tringali, M. D. y T. M. Bert (1996). The genetic stock structure of common snook (*Centropomus undecimalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(5): 974-984.
- Tringali, M. D., T. M. Bert y S. Seyoum (1999a). Genetic identification of Centropomine fishes. *Transaction of the American Fisheries Society*, 128: 446-458.

- Tringali, M. D., T. M. Bert, S. Seyoum, E. Bermingham y D. Bartolacci (1999b). Molecular phylogenetics and ecological diversification of the transisthmian fish genus *Centropomus* (Perciformes: Centropomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13(1): 193-207.
- Tucker, J. W., Jr. (1987). Snook and tarpon snook culture and preliminary evaluation for commercial farming. *Progressive Fish-Culturist*, 49(1): 49-57.
- Tucker, J. W., Jr. (1998). Marine Fish Culture. Kluwer Academic Publishers. Boston, EU. 750 pp.
- Tucker, J. W., Jr. (2001). Aquaculture snook. *Proceeding of the World Aquaculture 2001 Symposium*. Lake Buena Vista, Fla. E.U. p.549.
- Tucker, J. W., Jr., M. P. Landau y B. E. Faulkner (1985). Culinary value and composition of wild and captive common snook *Centropomus undecimalis*. *Florida Scientist*, 48(4): 196-200.
- Tucker, J. W., Jr. y S. M. Warlen (1986). Aging of common snook *Centropomus undecimalis* larvae using sagittal daily growth rings. *Northeast Gulf Science*, 8(2): 173-176.
- Tucker, J. W., Jr. y S. W. Campbell (1988). Spawning season of common snook along the east central Florida coast. *Florida Scientist*, 51(1): 1-6.
- Tyler, C. R. y J. P. Sumpter (1996). Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 6: 287-318.
- Volpe, A. V. (1959). Aspects of the biology of the common snook *Centropomus undecimalis* (Bloch) of southwest Florida. *Fla. State Bd. Conserv. Tech. Ser. No. 31*, 37pp.
- Wallace, R. A., S. M. Boyle, H. J. Grier, K. Selman y T. R. Petrino (1993). Preliminary observations on oocyte maturation and other aspects of reproductive biology in captive female snook, *Centropomus undecimalis*. *Aquaculture*, 116(2-3): 257-273.
- Wallace, R. A. y K. Selman (1981). Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologist*, 21: 325-343.
- Watanabe, W. O., E. P. Ellis, S. C. Ellis y M. W. Feeley (1998). Progress in controlled maturation and spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus* broodstock. *Journal of the World Aquaculture Society*, 29(4): 393-404.
- Yamamoto, K. y F. Yamazaki (1961). Rhythm of development in the oocyte of the gold-fish, *Carassius auratus*. *Bulletin Faculty Fisheries Hokkaido University*, 12:93-110.
- Yamamoto, K. y H. Yoshioka (1964). Rhythm of development in the oocyte of the medaka, *Oryzias latipes*. *Bulletin Faculty Fisheries Hokkaido University*, 15: 5-20.

- Yoshiura, Y., H. Suetake y K. Aida (1999). Duality of gonadotropin in a primitive teleost, japanese eel (*Anguilla japonica*). *General and Comparative Endocrinology*, 114: 121-131.
- Zohar, Y. (2000). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system in teleost fish: assembling an endocrine puzzle. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on fish endocrinology*. July 31-August 3, 2000. University of Washington and Northwest Fisheries Science Center, Seattle, Washington.