

# TÉCNICAS PARA EL CONTROL DE MADURACIÓN DE ESPECIES ÍCTICAS NATIVAS

Juan Felipe Sierra-De la Rosa

Corporación Centro de Investigación de la Acuicultura de Colombia – CENIACUA e-mail: jsierra@ceniagua.org

Revista Electrónica de Ingeniería en Producción Acuícola  
año II, vol. 2, 2007. ISSN 1909 - 8138

## RESUMEN

La reproducción en los peces está regulada por mecanismos internos (endocrinos) y factores medioambientales. Estos últimos desencadenan una cascada de eventos de desarrollo reproductivo a través del eje hipotálamo-pituitaria-gonadal. El hipotálamo produce las hormonas liberadoras de gonadotropina (GnRH), las cuales estimulan la glándula pituitaria para producir las hormonas gonadotrópicas (GtH), que su vez actúan sobre las gónadas. En los reproductores criados en cautiverio ocurren diferentes grados de disfunciones reproductivas debido a que las condiciones de cultivo son diferentes a las de las áreas naturales de desove. También puede ser deseable interrumpir algunos procesos de desarrollo reproductivo con el fin de incrementar los rendimientos productivos. Mediante la manipulación de las variables ambientales y el suministro de hormonas exógenas es posible sortear las diferentes disfunciones o inhibir ciertos procesos. Las principales sustancias empleadas para la inducción hormonal son los extractos de pituitaria y las gonadotropinas purificadas para estimular ovarios y testículos y los análogos de hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH<sub>a</sub>) que solos o en combinación con inhibidores de la Dopamina actúan a nivel de la pituitaria fomentando la liberación de gonadotropinas propias del pez. De esta manera se logra la maduración final del ovocito (FOM), la ovulación, el desove y la espermiación. Tales tratamientos pueden suministrarse de forma aguda o crónica, siendo esta última la más conveniente en términos de efectividad y de manipulación del grupo de reproductores. Palabras clave: Foto periodo, temperatura, inducción hormonal, hormonas gonadotrópicas, hormonas liberadoras de gonadotropina, tratamientos agudos, tratamientos crónicos

## 1 BIOLOGÍA REPRODUCTIVA BÁSICA

Los procesos reproductivos en peces están controlados por ritmos biológicos endógenos y por señales medioambientales conformadas por factores últimos (calidad de agua, disponibilidad de alimento, depredación) que determinan dónde y cuándo debe ocurrir el nacimiento de la progenie y factores proximales (foto periodo y temperatura, apariencia del sitio de desove, feromonas) que sirven para adaptar los procesos reproductivos a ciclos ambientales. Las señales ambientales son captadas por los órganos y transmitidos al sistema nervioso en señales fisiológicas que generan respuestas. La principal ruta de comunicación entre el sistema nervioso central y las gónadas es el sistema endocrino, a través del eje hipotálamo-pituitaria-gonadal (Rottman et al., 1991; Munro, 1990; Stacey, 1984).

La glándula pituitaria (localizada en el hipotálamo) es la encargada de producir las hormonas gonadotrópicas o gonadotropinas (GtH – particularmente la hormona luteinizante LH) y un potente factor estimulador del hipotálamo es la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). En algunos teleósteos, la dopamina actúa como un factor inhibitorio de liberación de gonadotropina. En el folículo ovárico (unidad básica del ovario) La GtH genera una activación de las enzimas sintetizadoras de los esteroides testosterona (T) y Estradiol (E2), y es este último quien estimula la síntesis hepática de vitelogenina (Vtg), que es activamente transportada al ovocito mediante la GtH. Los teleósteos producen dos tipos de GtH en la pituitaria, la GtH-I y la GtH-II, que están involucradas en el crecimiento folicular y en la maduración, respectivamente (Zohar y Mylonas, 2001; Patiño, 1997).

### Patrones de desarrollo reproductivo

El tejido germinal en la gónada en desarrollo se diferencia en espermatogonias (machos) y ovogonias (hembras) y puede ser manipulado mediante tratamientos hormonales o por cambios en variables ambientales, particularmente la temperatura. Algunas especies de peces sufren inversión de sexos en diferentes etapas de su vida, desarrollándose primero como machos (protándricos) o como hembras (protogínicos).

### Hembras

Las ovogonias se desarrollan inicialmente en huevos previtelogénicos; el comienzo de la maduración está señalado por la síntesis hepática de vitelogenina y la subsecuente toma de esta por parte de los ovocitos en desarrollo (el tejido ovárico crece). Después de que se ha completado la vitelogénesis, los folículos post-vitelogénicos sufren la maduración final del ovocito (FOM), que se caracteriza por la migración del núcleo o vesícula germinal al polo animal del ovocito. Los ovocitos que han completado la FOM son liberados del ovario mediante la ruptura del folículo ovárico al interior del oviducto. Las formas de desarrollo y maduración de gametos determinarán la disponibilidad de semilla (alevinos) en términos de cantidad y frecuencia. Existen tres formas de desarrollo ovocitario: 1) Desarrollo sincrónico: hay un único grupo de ovocitos en maduración y se presenta en especies que desovan una sola vez en la vida y que luego mueren (salmón del Pacífico, anguilas); 2) Desarrollo de grupo sincrónico: se refiere a especies que desovan más de una vez a lo largo de su vida pero típicamente solo una vez por temporada; el ovario contiene un grupo de ovocitos pre-vitelogénicos y un grupo destinado a maduración y ovulación durante la temporada de desove (especies de aguas frías) y 3) Desarrollo sincrónico de múltiples grupos (o desarrollo asincrónico): se refiere a las especies que presentan más de un grupo de ovocitos en desarrollo y es característico de especies que desovan varias veces dentro de una misma temporada de desove (peces tropicales).

### Machos

Las espermatogonias se dividen mitóticamente a espermatocitos primarios que sufren divisiones meióticas para formar espermatocitos secundarios. Estos se dividen a su vez para formar espermátidas (espermatogénesis) y finalmente espermatozoides (espermioogénesis) dentro de los lóbulos adyacentes a los tubos colectores de esperma. El desarrollo culmina en la liberación de los espermatozoides maduros a los conductos de esperma (espermación). Los patrones de sincronía de gametos de las hembras se ven

reflejados en los machos, puesto que los machos de las especies que tienen desarrollo sincrónico de múltiples grupos presentan sus células germinales en diferentes estadios (Zohar, 1989).

## 2 PROBLEMAS DE LA ACUACULTURA RELACIONADOS CON LA REPRODUCCIÓN

### Disfunciones reproductivas en los bancos de reproductores

Muchas de las especies de peces criadas en cautiverio presentan disfunciones reproductivas (usualmente más serias en hembras que en machos) debido a que las condiciones de cultivo son distintas a las de las áreas naturales de desove. En las hembras, las fallas reproductivas pueden clasificarse en tres tipos: la más básica de todas es la ausencia total de desarrollo reproductivo (el ovario permanece en estadio previtelogénico) y suele presentarse en los reproductores provenientes del medio natural (silvestres). El siguiente y más común problema ocurre en los peces que completan la vitelogenénesis pero fallan en completar la maduración final del ovocito (FOM) y/o ovulación con el consecuente desarrollo de atresia. El tercer problema ocurre cuando los ovocitos pasan la FOM y ocurre la ovulación pero no ocurre el desove; estos huevos pueden ser reabsorbidos o liberados tiempo después, donde los ovocitos ya no pueden ser fertilizados como ocurre con algunos meros *Epinephelus* sp (Tucker, 1994). En los machos los problemas suelen relacionarse con reducciones de la producción y/o calidad de esperma. Los reproductores silvestres capturados durante la temporada reproductiva y puestos en cautiverio producen espermatozoides sin motilidad o de una alta viscosidad que impide la mezcla apropiada con los huevos.

### Sincronización de los desoves

La rentabilidad de los cultivos comerciales de peces puede afectarse negativamente si no existe control en el tiempo de producción de gametos. En primer lugar se debe procurar la obtención de desoves durante todo el año con el fin de maximizar el uso de la infraestructura y en segundo lugar debe garantizarse la sincronía reproductiva en cada temporada de desove para reducir los costos de administración y operación.

### Proporción sexual

Existen tres opciones para controlar el sexo: 1) la hibridación Inter-específica, 2) el tratamiento hormonal con esteroides y 3) la manipulación genética del juego de cromosomas. En los peces

## 3. ESTRATEGIAS DE SOLUCIÓN

### Control del sexo

Existen tres opciones para controlar el sexo: 1) la hibridación Inter-específica, 2) el tratamiento hormonal con esteroides y 3) la manipulación genética del juego de

cromosomas. En los peces la manifestación de sexo comprende dos procesos: la determinación sexual, que depende de la combinación cromosómica (formación del cigoto) y la diferenciación sexual, ligada al desarrollo ontogénico e influenciada por diferentes factores que hacen que el sexo genotípico (XX y XY) se desarrolle en fenotípico (hembras o machos). Las técnicas de manipulación hormonal actúan sobre la diferenciación sexual mientras que las técnicas de manipulación genética actúan sobre la determinación sexual.

#### La manipulación hormonal

Emplea esteroides para redirigir el sexo establecido en el momento de la fertilización hacia el sexo opuesto o hacia la no expresión (individuos estériles). La feminización directa se logra mediante la aplicación de estrógenos (p. Ej. 17 $\beta$  estradiol – E2) en el agua o en la dieta en estados tempranos de desarrollo mientras que la feminización indirecta se logra con la fertilización de huevos con esperma de machos fenotípicos que son genotípicamente hembras (se emplea el esperma de machos fenotípicos-hembras genotípicas en huevos de hembras genotípicas-fenotípicas. El resultado será una población 100% hembras, que es masculinizada y cruzada con hembras verdaderas, para continuar obteniendo hembras. La masculinización hormonal con andrógenos (p. ej. 17 a metil testosterona - MT) también puede ser directa o indirecta, y sigue los mismos principios descritos anteriormente. La manipulación genética emplea el juego de cromosomas para obtener hembras (ginogénesis), machos (androgénesis) o individuos estériles (triploidía) (Donaldson y Hunter, 1983).

#### Tratamientos de inducción al desove

Como se señaló anteriormente, muchas especies de peces de importancia comercial no se reproducen en cautiverio y por lo tanto deben emplearse métodos para inducir el desove. En otras especies comerciales que sí se reproducen en cautiverio, también se emplean tratamientos con el fin ejercer mayor control de los procesos e incrementar la eficiencia en el uso de las instalaciones. Los tratamientos pueden ser ambientales (no invasivos) o de administración de sustancias para intervenir directamente en el proceso fisiológico de la reproducción (invasivos). Éstos últimos pueden ser agudos (rápidos) o crónicos (lentos). Los desoves naturales obtenidos a partir de tratamientos no invasivos producen mayor cantidad de larvas viables en comparación con los desoves naturales obtenidos por métodos invasivos (Álvarez-Lajonchere y Hernández Molejón, 2001; Stacey, 1984). La domesticación reduce progresivamente los problemas reproductivos (Babaro et al., 1997).

#### Tratamientos no invasivos

Los ciclos reproductivos de los peces están condicionados por ciclos anuales de foto periodo y temperatura, lo cual significa que la manipulación de estas variables puede emplearse para cambiar la fase del tiempo de reproducción. La exposición de los peces a uno o más ciclos comprimidos anuales de foto periodo, seguidos por la expansión de un ciclo anual largo permite la manutención de varios reproductores en diferentes tiempos de desove para un suministro extendido de semilla. Los cambios en las variables físico químicas deben ser lentos: foto periodo 1-2 horas cada semana; temperatura 1-2° C cada semana; salinidad 1-2 partes cada semana. Los métodos ambientales deben complementarse con una excelente alimentación (favorece el

desarrollo reproductivo y la viabilidad de las larvas), la presencia del sexo opuesto y adecuaciones físicas que simulen el hábitat natural. El factor más crítico en el ambiente de cultivo es la reducción del estrés fisiológico en los reproductores puesto que inhibe todos los niveles del control endocrino (Peter & Yu, 1997).

En Colombia las técnicas no invasivas de inducción han arrojado resultados positivos en reproductores silvestres de peces marinos comerciales el pargo palmero *Lutjanus analis* y el mero guasa (*Epinephelus itajara*). En el pargo la manipulación del foto-periodo y la temperatura reactivó el desarrollo reproductivo que se había sido bloqueado por estrés del confinamiento, aunque una vez obtenida la maduración fue necesario emplear tratamientos invasivos para la obtención del desove. En el mero guasa se obtienen de manera periódica desoves gracias a un adecuado entorno ambiental y a la presencia de numerosos individuos de la especie (Bases datos CENIACUA; CEINER, datos sin publicar).

#### Tratamientos invasivos agudos

#### Preparaciones de gonadotropina (GtH)

- Hipofisación y extractos de pituitaria de peces: se refiere al uso de hipófisis maceradas y extractos de pituitaria para inducir el desove en peces, que son más efectivas si se extraen durante la temporada reproductiva, como resultado de una acumulación de GtH (principalmente LH) antes y durante la temporada de desove. Las pituitarias se almacenan en alcohol o en acetona y son molidas en solución salina antes de ser inyectadas en dos dosis a los peces empleando animales (donantes y receptores) de pesos similares a una proporción de 1:1 para machos de 1,5:1 para hembras; la dosis inicial en el 10-20% del total (2-10 mg de pituitaria/Kg de peso), suministrando la dosis definitiva a las 12-24 horas. Las desventajas de este método son la gran variabilidad en el contenido de LH, la administración de otras hormonas presentes que pueden afectar la fisiología de los peces receptores y la potencial transmisión de enfermedades de los donantes a receptores. Posteriormente se realizaron preparaciones purificadas o parcialmente purificadas de LH a nivel comercial aunque debido a la especificidad de la LH de peces, las gonadotropinas disponibles eran útiles sólo para las especies filogenéticamente relacionadas. (Lam, 1982; Zohar & Mylonas, 2001; Peter & Yu, 1997)
- Gonadotropina coriónica Humana (hCG): disponible en preparaciones de grado clínico en todo el mundo con potencia calibrada según estándares internacionales, presenta un mayor tiempo de retención en la circulación. Dosis entre 100-4000 UI/Kg. Como desventajas hay evidencias de que al ser aplicadas durante varios años se desarrolle una respuesta inmune, requiriendo mayores dosis cada vez o convirtiéndose en un tratamiento poco efectivo. Una ventaja es que actúa directamente sobre la gónada y no requiere la existencia de fuentes de LH
- Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y sus análogos: descubierta inicialmente en mamíferos, controla la liberación de LH (LH-RH o GnRH de mamífero) cuya aplicación inducía el desove en peces cultivados. Posteriormente, se desarrollaron análogos sintéticos (GnRHAs) que demostraron ser entre 30-100 veces más potentes que los péptidos nativos (mayor resistencia a la degradación enzimática) en la inducción del desarrollo ovárico, maduración final del ovocito y ovulación empleando dosis entre 1-5 mg/Kg o de 1-100 µg/Kg. La eficiencia de estos análogos comprobó la hipótesis de que

en los peces con disfunciones reproductivas, la pituitaria es aun capaz de sintetizar y liberar las gonadotropinas endógenas. El uso de estas sustancias presenta ventajas sobre el uso de las preparaciones de GtH (hCG) y es que no dispara una respuesta inmune y permite su uso en subsecuentes temporadas de desove sin la reducción de su eficacia. Mediante la inducción de la liberación de LH propias del pez (LH endógeno), las GnRH reparan la disrupción endocrina que hace que los peces no alcancen la FOM, la ovulación y el desove. Además las GnRH actúan en un nivel más alto del eje hipotálmo-pituitaria-gonadal suministrando una estimulación balanceada de los eventos reproductivos. Otra ventaja de las formas sintéticas es que evita el riesgo de transmisión de enfermedades y puede emplearse de forma directa, a diferencia de las gonadotropinas, que requieren de parentesco filogenético en muchas especies de peces dada la gran similitud entre sus GnRHs. La administración de estos compuestos se ha realizado principalmente a través de inyecciones y sistemas sostenidos de liberación. Los antagonistas de la dopamina se han empleado conjuntamente con las GnRH (dos dosis de GnRH y una dosis de antagonista de DA al momento de la primera de GnRH) debido a que la dopamina en algunas especies (ciprínidos y bagres de canal) inhibe la liberación de GtH.

#### Tratamientos invasivos crónicos (implantes hormonales)

Está demostrado que la administración sostenida de GnRH mejora la eficiencia del tratamiento hormonal permitiendo sincronizar la ovulación y desove de algunas especies, adelantar el periodo de desove, inducir a la maduración final y desove en especies difíciles, inducir desoves múltiples. Sin embargo, resulta engorrosa además de estresar fuertemente a los reproductores, producir altas mortalidades pre-ovulatorias o afectar la progresión de la FOM. Aunque los análogos de GnRH son más resistentes a la degradación enzimática permitiendo estimulaciones más prolongadas de liberación de GtH, su duración en el torrente sanguíneo es aun insuficiente para inducir la FOM en algunas especies, o insuficiente para generar ovulación en peces cuyo desarrollo gonadal no está muy avanzado.

El tratamiento con estos sistemas durante el periodo de pos-vitelogénesis induce elevaciones significativas de LH en plasma que se mantienen durante algún tiempo después de la ovulación, aunque el tiempo es variable entre especies. Una de sus aplicaciones es la sincronización de la ovulación y la obtención del desove en especies que si bien ovulan, no desovan en cautiverio, facilitando la colección de huevos y reduciendo el chequeo estresante de hembras. Estos sistemas también tienen gran potencial en la inducción de múltiples desoves en especies marinas de desarrollo ovárico sincrónico múltiple (asincrónico)

Los sistemas crónicos de GnRH también han probado su efectividad en el mejoramiento de la producción de esperma ofreciendo ventajas sobre los tratamientos agudos de estos mismos compuestos puesto que en estos últimos una única inyección induce elevaciones transitorias (pocos días) de plasma seminal con muy poco incremento de producción de espermatozoides (mayor producción de esperma pero bajo espermatocrito). La inducción a la espermiación con sistemas crónicos incrementa la cantidad de espermatozoides por tiempos mucho más prolongados (30 días) sin comprometer su densidad y motilidad. Al igual que en las hembras, los tratamientos crónicos con GnRH inducen una elevación sostenida de LH en plasma, seguida de los incrementos en testosterona. En los últimos 30 años se han desarrollado numerosos sistemas para suministrar GnRH y desarrollar la FOM, la ovulación y la espermiación.

- Comprimidos de colesterol / celulosa y silicona: se preparan en forma de pellet sólido y cilíndrico ( $\varnothing \sim 3$  mm) que se implantan intramuscular o intraperitonealmente, mediante un implantador o escalpelo. Al variar el porcentaje de colesterol en los implantes se obtienen diferentes velocidades de liberación manteniendo los niveles de GnH en plasma por varias semanas-meses (colesterol 25% - celulosa 75% para estímulos rápidos y colesterol del 95-100% para estímulos lentos en la maduración final y el desove). Esto implantes son relativamente baratos y fáciles de preparar aunque la liberación de hormona parece ser extremadamente variable.
- Microesferas (5-200  $\mu\text{m}$ ): son preparadas con copolímeros de ácido láctico y ácido glicólico (LGA) que se inyectan en una solución de varios compuestos. La liberación de GnRH es inmediata y puede durar semanas o meses dependiendo de la proporción de ácido láctico:ácido glicólico y de la longitud del polímero. También existen micro esferas preparadas de copolímeros de ácidos grasos y ácido cebáístico. Son fácilmente administrables, biodegradables y se pueden eliminar de la musculatura de los peces; permite la administración a reproductores entre 20 g y 20 Kg sin realizar una preparación especial. Recientemente se han desarrollado micro esferas específicas para peces teniendo en cuenta la baja temperatura corporal de los peces en comparación con los mamíferos y que se han probado con éxito en dorada y salmones (Mylonas et al., 1993; Zohar 1996 En: Zohar y Mylonas, 2001)
- Copolímeros sólidos no degradables (etileno y acetato de vinil – EVAc) de liberación rápida o lenta en forma de discos de 2-3 mm implantados bajo la piel; a diferencia de las microesferas y similar a los pellets de colesterol, los EVAc tienen una larga vida y mantiene su efectividad ( $> 3$  años) si se almacenan disecados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Sistemas crónicos de liberación de GtH: aunque los sistemas crónicos de GnRHa son efectivos para inducir la FOM, ovulación y desove en hembras y mejoramiento de la espermiación en machos, no son efectivos en reproductores que no están en las etapas finales de desarrollo gonadal. Una posible explicación para esto es que la pituitaria presenta menor respuesta a GnRHa y por lo tanto las GtH no son sintetizadas o no son liberadas. La efectividad del co-tratamiento de GnRHa con T en la inducción de la síntesis /liberación de GtH y gonadogénesis en algunas especies de peces, sugiere que la pituitaria debe ser primero expuesta a esteroides gonadales antes de que la GnRHa pueda estimular la liberación de GtH. Por lo tanto, las preparaciones de GtH pueden ser más apropiadas que las de GnRHa para estimular los estadios tempranos de gonadogénesis, aunque deben suministrarse semanalmente durante muchos meses. Por lo tanto, deben desarrollarse sistemas de liberación crónica para evitar los daños en los reproductores y de esta manera emplear 2-3 dosis/temporada reproductiva. Estos sistemas se han desarrollado usando una emulsión de gelatina liofilizada (LG) que es cargada con LH purificada de salmón o empleando polímeros biodegradables cargados con HCG en polvo que pueden inyectarse en los peces.

Los métodos hormonales que se usan actualmente para el control de la maduración sólo han experimentados ligeros cambios en los últimos 60 años. Su implementación en las especies nativas debe complementarse con un óptimo ambiente de cultivo (incluida la nutrición) con el fin de minimizar los efectos adversos del cautiverio en el sistema endógeno del GnRH.

## REFERENCIAS

BABARO, A., A. FRANCESCON, G. BOZZATO, A. MERLIN, P. BELVEDERE y L. COLOMBO. 1997. Induction of spawning in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., by

- long-acting GnRH $\alpha$  and its effects on egg quality and daily timing of spawning. *Aquaculture* 154, 349-359 pp.
- DONALDSON, E.M y HUNTER G.A. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. En: *Fish Physiology*. W.S. Hoar, D.J. Randall y E. M. Donaldson Edit. V. IXB. Academic Press N.Y. 351-403 pp.
- LAM, T. J. 1982. Applications of endocrinology to fish culture. *Can J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 111-137 pp.
- MUNRO, A.D. 1990. General introduction. En: *Reproductive seasonality in teleosts: environmental influences*. Edit. A.D. Munro, A.P. Scott y T.J. Lam. CRC Press, Florida. 1-11 pp.
- PANKHURTS AÑO. Reproducción. En: *Biology of Farmed Fish*. Editors K.D. Black and A.D. Pickering). Pp 1-26. Sheffield Academic Press.
- PETER, R.E & K.L YU. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. En: *Reviews in fish biology and fisheries*. 1997. Vol 7 (2). 173-197 pp.
- ROTTMANN, R.W., J.V. SHIREMAN and F.A. CHAPMAN. 1991. Hormonal control of reproduction in fish for induced spawning. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication N° 424. USA.
- STACEY, N.E. 1984. Control of the timing of ovulation by exogenous and endogenous factors. En: *Fish reproduction: Strategies and tactics*. G.W. Potts & R.J. Wootton. Academic Press. 207-221 pp.
- TUCKER, JW. 1994. Spawning of captive serranid fishes: a review. *J. World Aquacult. Soc.* 25, 345-359
- ZOHAR, Y. 1989. Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. En: *Fish culture in warm water systems: problems and trends*. M. Shilo and S. Sarig Edit. CRC Press, Inc. Florida. 65-119 pp.
- ZOHAR, Y. & C. MYLONAS. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultures fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197. 2001. 99-136 pp.