

La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura



MANUEL ADRIÁN CARRILLO ESTÉVEZ
(Coordinador)

La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura



MANUEL ADRIÁN CARRILLO ESTÉVEZ

(Coordinador)

JOSÉ ANTONIO MUÑOZ CUETO

S. ZANUY, M. CARRILLO, A. ROCHA, G. MOLÉS

M. CARRILLO, S. ZANUY, M.^a JOSÉ BAYARRI

FRANCESC PIFERRER

H. FERNÁNDEZ-PALACIOS Y M.S. IZQUIERDO

JOAN CERDÀ

M.^a PAZ HERRÁEZ

JOSÉ MARÍA NAVAS

JOSÉ PEDRO CAÑAVATE

VICENTE GRACIA LÓPEZ, IVÁN VALDEBENITO ISLER

**FUNDACIÓN OBSERVATORIO ESPAÑOL DE ACUICULTURA
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO**

MADRID, 2009

Reservados todos los derechos por la legislación en materia de Propiedad Intelectual.

Las noticias, asertos y opiniones contenidos en esta obra son de la exclusiva responsabilidad del autor o autores. La editorial, por su parte, sólo se hace responsable del interés científico de sus publicaciones.

Catálogo general de publicaciones oficiales:

<http://www.060.es>

Serie:

**Publicaciones Científicas y Tecnológicas
de la Fundación Observatorio Español de Acuicultura**



© Fundación Observatorio Español de Acuicultura

© CSIC

© Manuel Adrián Carrillo Estévez

© Editor Científico: Dr. Juan Espinosa de los Monteros

ISBN: 978-84-00-08842-2

NIPO: 472-09-111-7

Depósito Legal: M-27384-2009

Diseño y maquetación: DiScript Preimpresión, S. L.

ÍNDICE

PRÓLOGO	17
1. CEREBRO Y REPRODUCCIÓN EN PECES: BASES NEURALES Y NEUROENDOCRINAS	25
1.1. INTRODUCCIÓN	28
1.2. EL ÓRGANO PINEAL: INTEGRACIÓN NEURAL Y NEUROENDOCRINA DE LA INFORMACIÓN AMBIENTAL	29
1.2.1. Organización anatómica y tipos celulares	32
1.2.2. Conexiones neurales	34
1.2.3. Secreción de melatonina y efectos sobre el eje reproductivo	36
1.3. EL CEREBRO NEUROENDOCRINO	40
1.3.1. Inervación de la hipófisis en peces: áreas hipofisiotróficas y neuroendocrinas implicadas en el control de la reproducción	41
1.3.2. Dos sistemas neuroendocrinos principales dirigen la reproducción en peces	43
1.3.2.1. Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)	44
1.3.2.2. Dopamina	58
1.3.3. Otros sistemas neuroendocrinos implicados en el control de la reproducción: Neuropeptido Y, GABA y otras neurohormonas	61
1.3.4. ¿Que hay de nuevo en el estudio del cerebro neuroendocrino?	66
1.3.4.1. Kisspeptinas	66
1.3.4.2. Hormona inhibidora de las gonadotrofinas (GnIH)	69
1.4. TRANSDUCCIÓN DE LA INFORMACIÓN DE LOS CENTROS FOTORRECEPTORES HACIA LOS CENTROS NEUROENDOCRINOS Y LA HIPÓFISIS	71
1.5. AGRADECIMIENTOS	74
BIBLIOGRAFÍA	75



2. REGULACIÓN Y CONTROL HORMONAL DEL PROCESO REPRODUCTOR DE LOS TELEÓSTEOS.....	97
2.1. INTRODUCCIÓN.....	100
2.2. LAS GONADOTROFINAS.....	102
2.2.1. La dualidad de las gonadotrofinas de los peces.....	102
2.2.2. Estructura de las gonadotrofinas	103
2.2.3. Síntesis y secreción	105
2.2.4. Acción fisiológica.....	108
2.2.5. Purificación, clonación y formas recombinantes de las gonadotrofinas	109
2.2.6. Métodos o sistemas de cuantificación de GTHs.....	114
2.3. LOS RECEPTORES DE LAS GONADOTROFINAS	117
2.3.1. Clonación de los receptores de las gonadotrofinas	118
2.3.2. Principales atributos de los receptores de las gonadotrofinas deducidos a partir de sus secuencias de cDNA	119
2.3.3. Estructura y organización de los genes de los receptores de las gonadotrofinas	124
2.3.4. Interacción hormona-receptor	125
2.3.5. Expresión de los receptores de las gonadotrofinas.....	129
2.4. LAS GÓNADAS	134
2.4.1. Origen y organización anatómica	134
2.4.2. Estructura y desarrollo testicular.....	135
2.4.3. Espermatogénesis y regulación endocrina	138
2.4.4. Estructura y tipos de desarrollo ovárico.....	144
2.4.5. Previtelogénesis y su control endocrino	146
2.4.6. La vitelogénesis y su control endocrino	149
BIBLIOGRAFÍA	154
3. EL CONTROL AMBIENTAL DE LA REPRODUCCIÓN DE LOS PECES CON ESPECIAL REFERENCIA AL CONTROL DEL CICLO SEXUAL, DE LA PUBERTAD Y DE LA PRECOCIDAD	173
3.1. INTRODUCCIÓN.....	176
3.2. ORIGEN DE LAS PERIODICIDADES.....	177
3.2.1. Generalidades.....	177



3.2.2. Factores próximos.....	179
3.2.3. Factores últimos.....	180
3.3. ADAPTACIÓN FISIOLÓGICA A LOS CAMBIOS AMBIENTALES MEDIANTE EL DIÁLOGO ENDOCRINO ENTRE EL MEDIO AMBIENTE EXTERNO E INTERNO DEL ANIMAL.....	181
3.4. LA FOTOPERIODICIDAD Y TEMPERATURA EN LOS TELEÓSTEOS.....	184
3.4.1. Los efectos del fotoperiodo en la alteración de la época de puesta ...	185
3.4.2. Respuesta a fotoperiodos y temperaturas naturales desfasados	186
3.4.3. Respuesta a fotoperiodos naturales comprimidos y expandidos	187
3.4.4. Respuesta a fotoperiodos constantes	190
3.4.5. La temperatura como factor limitante de la puesta	194
3.4.6. Mecanismos de acción.....	195
3.4.7. Interacciones fotoperiodicas y térmicas.....	197
3.4.8. Conclusiones	202
3.5. RITMOLOGÍA DEL PROCESO REPRODUCTOR EN TELEÓSTEOS	202
3.5.1. Ritmos endógenos.....	202
3.5.1.1. Conceptos y requerimientos necesarios para su aceptación	202
3.5.1.2. Ritmos endógenos circa-anales: un caso de estudio	204
3.5.1.3. Mecanismos de acción	205
3.5.1.4. Comprobación de estos mecanismos en un caso concreto	208
3.5.1.5. Conclusiones.....	208
3.5.2. Ritmos circadianos.....	209
3.6. ENLACE FOTO-ENDOCRINO DEL PROCESO REPRODUCTOR.....	210
3.6.1. Variación diaria y estacional de la melatonina.....	211
3.6.2. Modulación de la secreción de melatonina (orientación, espectro, intensidad de luz, temperatura).....	212
3.6.3. Posible existencia de ritmos endógenos de melatonina.....	214
3.6.4. Evidencias recientes del papel de la melatonina en la reproducción de los teleósteos.....	214
3.7. APLICACIONES DEL FOTOPERIODO A LA ACUICULTURA	215
3.7.1. Manipulación de la época de puesta para obtener puestas todo el año	215
3.7.2. Ejemplo del control ambiental de la reproducción de la lubina en una empresa acuícola	216
3.7.3. Conclusiones	219



3.7.4. Inhibición o retraso del proceso reproductor para mejorar el crecimiento	219
3.8. CONTROL DE LA PUBERTAD	220
3.8.1. Introducción y conceptos	220
3.8.2. Importancia	221
3.8.3. Cambios en el eje cerebro-hipófisis-gónadas durante la pubertad	222
3.8.4. Determinantes internos para el tiempo del inicio de la pubertad	226
3.8.5. El control ambiental de la pubertad	229
BIBLIOGRAFÍA	233
4. DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL EN LOS PECES	247
4.1. INTRODUCCIÓN	250
4.1.1. La proporción de sexos o el sex ratio	251
4.1.2. Estudios previos y enfoque	253
4.2. TIPOS DE REPRODUCCIÓN	254
4.2.1. Gonocorismo	255
4.2.2. Hermafroditismo	255
4.2.3. Unisexualidad	258
4.3. DETERMINACIÓN SEXUAL	260
4.3.1. Definición y mecanismos	260
4.3.2. Determinación sexual genotípica	262
4.3.2.1. Cromosomas sexuales en peces y su evolución	263
4.3.2.2. Genes determinantes del sexo y loci ligados al sexo	266
4.3.2.3. Sistemas polifactoriales	268
4.3.3. Determinación sexual ambiental	268
4.3.3.1. Determinación del sexo dependiente de la temperatura	270
4.3.3.2. pH y otros factores ambientales	274
4.3.4. Sistemas mixtos	274
4.3.5. El sexo como una dicotomía marcada por el umbral de un carácter continuo	275
4.3.6. Esclarecimiento de los mecanismos de determinación sexual	276
4.4. DIFERENCIACIÓN SEXUAL	279
4.4.1. Definición	279
4.4.2. Aspectos morfológicos	280



4.4.2.1. Relación sistema excretor-reproductor y primeros estadios	280
4.4.2.2. Etapas del proceso morfológico de la diferenciación sexual.....	280
4.4.2.3. Patrones. Especies diferenciadas e indiferenciadas	284
4.4.2.4. Intersexos.....	286
4.4.3. Control endocrino de la diferenciación sexual.....	287
4.4.3.1. Esteroides sexuales.....	287
4.4.3.2. Enzimas esteroideogénicas	288
4.4.3.2.1. <i>Aromatasa</i>	290
4.4.3.2.2. <i>11β-hidroxilasa</i>	293
4.4.3.3. Receptores de esteroides sexuales.....	293
4.4.3.4. Otros reguladores de la diferenciación sexual.....	296
4.4.4. Cerebro y diferenciación sexual. Control neuroendocrino.....	298
4.5. APLICACIONES A LA ACUICULTURA Y GESTIÓN DE RECURSOS.....	298
4.5.1. Aplicaciones a la acuicultura y a la acuarofilia.....	299
4.5.1.1. Problemática en hatcheries y durante la fase de engorde.....	300
4.5.1.2. Métodos para el control de la proporción de sexos	301
4.5.1.3. Control térmico de la diferenciación sexual.....	304
4.5.1.4. Aplicaciones a especies importantes en acuicultura.....	305
4.5.1.5. Percepción social	306
4.5.2. Gestión de poblaciones naturales y control de especies invasoras	306
4.6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	308
4.6.1. Tipos de reproducción.....	308
4.6.2. Determinación sexual.....	309
4.6.3. Diferenciación sexual	310
4.6.4. Aplicación a la acuicultura y a la gestión de recursos.....	311
BIBLIOGRAFÍA	312
5. EFECTOS DE LA DIETA DE LOS REPRODUCTORES SOBRE LA PUESTA	337
5.1 INTRODUCCIÓN.....	341
5.2. EFECTO DE LOS COMPONENTES DE LA DIETA.....	342
5.2.1. Lípidos.....	342
5.2.2. Proteínas	356
5.2.3. Vitaminas	362
5.2.4. Carotenoides.....	370



5.2.5. Otros nutrientes	373
5.3. EFECTO DEL NIVEL DE INGESTA	376
5.4. PERIODO DE TIEMPO NECESARIO PARA QUE LA DIETA INFLUYA SOBRE LA CALIDAD DE LA PUESTA	378
BIBLIOGRAFÍA	380
6. MECANISMOS MOLECULARES DURANTE LA MADURACIÓN Y OVULACIÓN DEL OOCITO DE TELEÓSTEOS: AVANCES RECIENTES Y SU APLICACIÓN EN ACUICULTURA	401
6.1. INTRODUCCIÓN	404
6.2. CONTROL MOLECULAR DE LA MADURACIÓN DEL OOCITO	405
6.2.1. Control de la parada meiótica en profase I	408
6.2.2. Regulación por gonadotropinas	408
6.2.3. Síntesis del MIS	409
6.2.4. El receptor del mis y mecanismo de transducción de señal	411
6.2.5. Formación y activación del MPF	413
6.2.6. Funciones del MPF	415
6.2.7. Competencia del oocito para la maduración	416
6.2.8. Mecanismos moleculares para el mantenimiento de la fertilizabilidad de los huevos	416
6.2.8.1. Parada meiótica de los huevos en metafase II	417
6.2.8.2. Funciones de Mos y MAPK durante la parada en metafase II	417
6.3. CONTROL PARACRINO DE LA MADURACIÓN DEL OOCITO	418
6.3.1. GnRH	418
6.3.2. Factores de crecimiento	420
6.3.3. Neurotransmisores	422
6.4. LA HIDRATACIÓN DEL OOCITO	423
6.4.1. Los aminoácidos libres como efectores osmóticos	426
6.4.2. Procesamiento de las proteínas del vitelo	430
6.4.2.1. Cambios ultraestructurales del vitelo durante la maduración del oocito	432
6.4.2.2. Procesamiento del vitelo en teleósteos pelagófilos y bentófilos	433
6.4.2.3. Función de la proteólisis del vitelo en teleósteos bentófilos	435
6.4.2.4. Papel de las proteasas en la hidrólisis de las proteínas del vitelo ...	436



6.4.3. Iones inorgánicos y otros efectores osmóticos de bajo peso molecular	439
6.4.3.1. Mecanismos para el transporte de iones al oocito.....	441
6.4.3.2. Papel de la comunicación intercelular para la traslocación de iones K ⁺	442
6.4.4. Mecanismos para el transporte de agua en el oocito.....	444
6.4.4.1. Estructura de las acuaporinas	444
6.4.4.2. Funciones fisiológicas de las acuaporinas.....	445
6.4.4.3. Papel de las acuaporinas durante la hidratación del oocito.....	446
6.5. REGULACIÓN DE LA OVULACIÓN	448
6.5.1. Mecanismos moleculares durante la ovulación.....	450
6.6. ASPECTOS APLICADOS EN ACUICULTURA	451
6.6.1. Biomarcadores de calidad de gametos	452
6.6.1.1. MPF	452
6.6.1.2. Catepsinas	453
6.6.1.3. Apoptosis.....	454
6.6.2. Acuaporinas y criopreservación de gametos	454
BIBLIOGRAFÍA	456
7. CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS Y EMBRIONES	475
7.1. LA CRIOBIOLOGÍA EN EL CONTEXTO DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL.....	478
7.1.1. La criobiología en el contexto de la acuicultura	481
7.2. PRINCIPIOS BÁSICOS DE CRIOBIOLOGÍA	487
7.2.1. Procesos físico-químicos asociados con la congelación de muestras biológicas.....	487
7.2.2. Crioprotectores.....	489
7.2.3. Alteraciones celulares producidas por la criopreservación.....	491
7.2.4. Diseño de un protocolo de criopreservación.....	495
7.3. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE PECES	496
7.3.1. Particularidades de la fisiología espermática de peces.....	496
7.3.2. Diseño de un protocolo para congelación de esperma de peces.....	497
7.3.2.1. Obtención del esperma	497
7.3.2.2. Selección del esperma: evaluación de la calidad seminal	499
7.3.2.3. Selección del diluyente: composición de la solución base y los CPTs	502



7.3.2.4. Envasado.....	505
7.3.2.5. Congelación: instrumental y rampas de temperatura	506
7.3.2.6. Descongelación.....	508
7.3.2.7. Fecundación.....	508
7.3.2.8. Instalaciones y equipamientos necesarios.....	509
7.3.3. Especies de interés comercial: resultados actuales y métodos de congelación	509
7.3.3.1. Congelación de semen de peces marinos	509
7.3.3.2. Congelación de semen de peces de agua dulce.....	511
7.3.4. Utilización de los bancos de esperma para recuperación de poblaciones.....	514
7.3.5. Objetivos futuros en la congelación de semen	515
7.3.6. Congelación vs. conservación en fresco	516
7.4. CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS.....	517
7.5. CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES (PUSTAS FECUNDADAS).....	518
7.5.1. Características específicas de los embriones de peces.....	518
7.5.2. Métodos de congelación: congelación lenta y vitrificación	520
7.5.3. Permeabilización de embriones a los crioprotectores y al agua	522
7.5.4. Resultados actuales y perspectivas de futuro	523
7.6. CRIOPRESERVACIÓN DE BLASTÓMEROS Y CÉLULAS SOMÁTICAS	525
BIBLIOGRAFÍA	526
8. LOS PERTURBADORES ENDOCRINOS Y SUS POSIBLES EFECTOS EN LA REPRODUCCIÓN DE PECES CULTIVADOS.....	531
8.1. INTRODUCCIÓN Y CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA PERTURBACIÓN («DISRUPCIÓN») ENDOCRINA.....	534
8.2. ALGUNOS PROCESOS QUE SE PUEDEN VER PERTURBADOS POR LA ACCIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS	537
8.2.1. Mecanismo de acción de los estrógenos.....	537
8.2.2. Producción de vitelogenina.....	538
8.2.3. Regulación de la producción y liberación de gonadotropinas.....	538
8.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PERTURBADORES ENDOCRINOS	540
8.3.1. Procesos de estrogenicidad.....	540
8.3.2. Procesos de antiestrogenicidad	541



8.4. PERTURBADORES ENDOCRINOS	544
8.4.1. Estrógenos naturales y sintéticos	545
8.4.2. Fitoestrógenos y micoestrógenos.....	547
8.4.3. Pesticidas organoclorados.....	548
8.4.4. Alquifenoles y derivados.....	551
8.4.5. Ftalatos y bisphenol-A.....	552
8.4.6. Dioxinas, furanos, hidrocarburos poliaromáticos.....	555
8.4.7. Bifenilos policlorados.....	557
8.4.8. Bifenilos polibromados y bifenil éteres polibromados	559
8.5. PERTURBACIÓN ENDOCRINA EN POBLACIONES DE PECES.	
EJEMPLOS CONCRETOS	561
8.5.1. Efectos estrogénicos en poblaciones de peces: producción de vitelogenina.....	561
8.5.2. Efectos estrogénicos en poblaciones de peces: alteraciones en el desarrollo gonadal	565
8.5.3. Efectos (anti)estrogénicos en poblaciones de peces	569
8.6. PERTURBADORES ENDOCRINOS Y PISCICULTURA	574
BIBLIOGRAFÍA	580
 9. RELEVANCIA DE LA REPRODUCCIÓN EN LA DIVERSIFICACIÓN DE LA PISCICULTURA MARINA EN ESPAÑA.....	 597
9.1. ASPECTOS GENERALES Y CONSIDERACIONES PREVIAS	601
9.2. PLANTEAMIENTOS ANTE EL ESTUDIO DE LA REPRODUCCIÓN DE NUEVOS PECES MARINOS.....	604
9.3. EVALUACIÓN DE RESULTADOS SOBRE LA REPRODUCCIÓN DE ESPÁRIDOS...	609
9.4. AVANCES EN LA REPRODUCCIÓN DE PECES PLANOS.....	615
9.5. ESTUDIOS SOBRE LA REPRODUCCIÓN DE PECES CON TALLA SUPERIOR.....	621
9.6. IMPORTANCIA DE LA REPRODUCCIÓN DENTRO DEL CICLO INTEGRAL DE PRODUCCIÓN DE NUEVAS ESPECIES	629
9.7. OPCIONES Y EXPECTATIVAS DE FUTURO	632
BIBLIOGRAFÍA	634



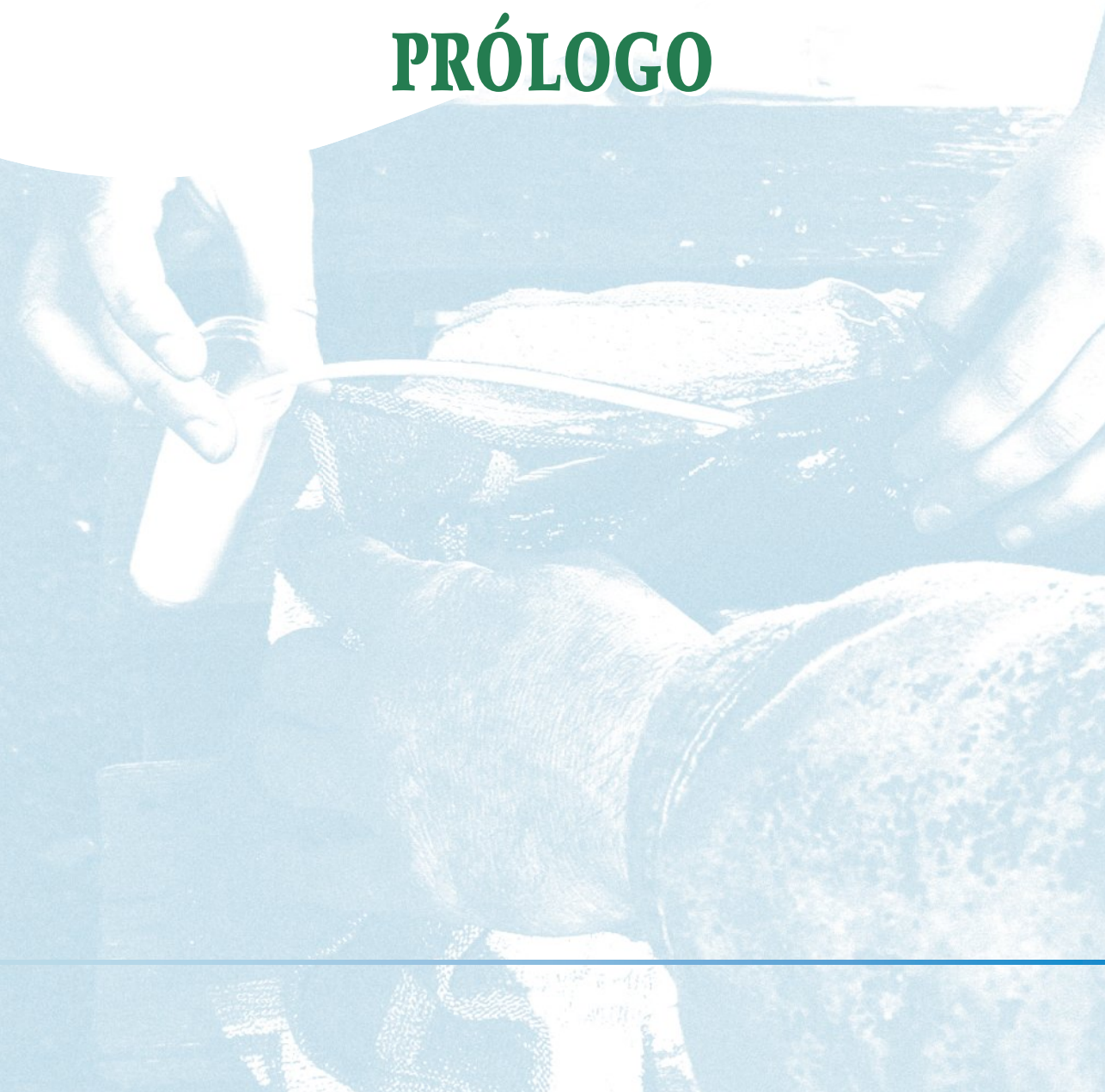
10. REPRODUCCIÓN DE PECES MARINOS Y DE AGUA DULCE EN LATINOAMÉRICA	643
10.1. REPRODUCCIÓN DE PECES MARINOS EN LATINOAMÉRICA	647
10.1.1. Introducción	647
10.1.2. <i>Carangidae</i> (jureles)	648
10.1.2.1. <i>Seriola dumerili</i> (medregal coronado)	648
10.1.2.2. <i>Seriola lalandi</i> (madregal o jurel aleta amarilla)	649
10.1.2.3. <i>Seriola peruana</i> (madregal o jurel fortune)	649
10.1.2.4. <i>Seriola rivoliana</i> (madregal limón, hojarán común, bojala o huayaipe)	649
10.1.3. <i>Centropomidae</i> (robalos)	650
10.1.3.1. <i>Centropomus medius</i> (robalo paleta o robalo aleta prieta)	650
10.1.3.2. <i>Centropomus parallelus</i> (robalo graso o chucumite)	650
10.1.3.3. <i>Centropomus undecimalis</i> (robalo común o blanco)	651
10.1.4. <i>Galaxiidae</i>	652
10.1.4.1. <i>Galaxias maculatus</i> (puye o inanga)	652
10.1.5. <i>Lutjanidae</i> (pargos o huachinangos)	652
10.1.5.1. <i>Lutjanus analis</i> (pargo criollo)	652
10.1.5.2. <i>Lutjanus argentiventris</i> (pargo amarillo)	653
10.1.5.3. <i>Lutjanus campechanus</i> (pargo colorado o huachinango del Golfo)	653
10.1.5.4. <i>Lutjanus griseus</i> (pargo mulato o caballere)	653
10.1.5.5. <i>Lutjanus synagris</i> (pargo biajaiba)	654
10.1.5.6. <i>Lutjanus peru</i> (huachinango del Pacífico)	655
10.1.5.7. <i>Ocyurus chrysurus</i> (rubia)	655
10.1.6. <i>Paralichthyidae</i> (lenguados)	655
10.1.6.1. <i>Etropus ectenes</i> (lenguado zapato)	655
10.1.6.2. <i>Paralichthys adspersus</i> (lenguado fino)	655
10.1.6.3. <i>Paralichthys californicus</i> (lenguado de California)	656
10.1.6.4. <i>Paralichthys microps</i> (lenguado de ojo chico)	657
10.1.6.5. <i>Paralichthys orbignyanus</i>	657
10.1.6.6. <i>Paralichthys woolmani</i> (lenguado huarache)	658
10.1.7. <i>Sciaenidae</i> (corvinas)	658
10.1.7.1. <i>Atractoscion nobilis</i> (corvina cabaicucho)	658
10.1.7.2. <i>Cynoscion nebulosus</i> (corvina pinta)	659
10.1.7.3. <i>Cynoscion xanthulus</i> (corvina de boca amarilla o boquinaranja)	660



10.1.7.4. <i>Micropogonias undulatus</i> (corvina gurrubata o roncadiná).....	660
10.1.7.5. <i>Pogonias cromis</i> (corvina negra o tambor negro)	660
10.1.7.6. <i>Sciaenops ocellatus</i> (corvina ocelada).....	661
10.1.8. Serranidae (Cabrillas)	
<i>Epinephelinae</i> (meros).....	661
10.1.8.1. <i>Mycteroperca rosacea</i> (cabrilla sardinera)	
<i>Serraninae</i>	661
10.1.8.2. <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> (cabrilla arenera o de roca)	665
10.1.9. Tetraodontidae (botetes)	666
10.1.9.1. <i>Sphoeroides annulatus</i> (botete diana)	666
10.2. REPRODUCCIÓN DE PECES DE AGUA DULCE EN LATINOAMÉRICA	667
10.2.1. Introducción	667
10.2.2. <i>Acipenseridae</i> (esturiones)	673
10.2.3. <i>Atherinopsidae</i> (charales y pejerreyes)	673
10.2.3.1. <i>Odontesthes bonariensis</i> (pejerrey).....	673
10.2.4. <i>Characidae</i> (carácidos).....	674
10.2.4.1. <i>Colossoma macropomum</i> (cachama negra o tambaqui)	674
10.2.4.2. <i>Piaractus mesopotamicus</i> (pacu o paco)	676
10.2.5. <i>Cichlidae</i> (tilapias).....	678
10.2.6. <i>Ciprinidae</i> (Carpas)	680
10.2.7. <i>Ictaluridae</i> (bagres de agua dulce)	684
10.2.7.1. <i>Ictalurus punctatus</i> (bagre de canal).....	684
10.2.8. <i>Osteoglossidae</i> (peces banda).....	685
10.2.8.1. <i>Arapaima gigas</i> (arapaima o paiche)	685
10.2.9. <i>Salmonidae</i> (Salmones y truchas)	686
10.2.10. Comentarios y recomendaciones	698
10.3. AGRADECIMIENTOS	700
BIBLIOGRAFÍA	700



PRÓLOGO







PRÓLOGO

M. Carrillo

La primera revisión en español de la reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura (S. Zanuy y M. Carrillo) apareció en 1987 como un capítulo del libro «Reproducción en Acuicultura» que también incluía la reproducción de moluscos, crustáceos y algas. Este libro, financiado por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (CAICYT) y editado por J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta, permitió recoger y actualizar la información proporcionada, por una serie de especialistas, en un curso para formación de Técnicos Superiores en Acuicultura impartido en el Pazo de Mariñán (Galicia) en 1986. Durante ese período, la acuicultura era una actividad a impulsar dado que los conocimientos fundamentales estaban en sus inicios y eran escasos. El lanzamiento de programas especiales de investigación y desarrollo (I+D) por la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (CAICYT), pioneros en España, ayudó a solventar estas graves deficiencias que la situaban en franca desventaja frente a otros países cuya investigación se iba adecuando al interés creciente de la actividad acuícola. Desde los años 70 hasta el presente, la acuicultura ha experimentado un avance imparable con un crecimiento aproximado de un 8,8% anual (Estadísticas de la FAO). En España, desde finales de la década de los 80 y durante el transcurso de dos décadas más, los avances en investigación y desarrollo, incluyendo personal, número de publicaciones e infraestructuras han sido considerables. Ello ha ido en paralelo con la producción acuícola mundial que en el 2004 alcanzó 45,5 millones de toneladas, frente a los 95 millones obtenidos por las pesquerías. Además, se vislumbra un balance positivo en favor de la acuicultura para la cual, en el 2010, se espera una producción de 53 millones de toneladas frente a los 93 millones esperados en las pesquerías. Han pasado ya 21 años desde la publicación de la pri-



mera revisión en el año 1987 y los avances en los conocimientos en reproducción de peces, hasta la actualidad, han sido muy importantes. Uno de los aspectos que ha cambiado notablemente es el número de especies de peces cultivadas, con claras tendencias a aumentar. A diferencia de los sistemas terrestres de producción animal, basados en un número limitado de especies animales y vegetales, en la producción acuícola figuran más de 240 especies de animales y plantas cultivadas, que representan a un total de 94 familias. De esta producción mundial por acuicultura el grupo de los peces es el que ocupa el primer lugar. Las estadísticas de la FAO indican que en el 2004 se produjeron 27 millones de toneladas de peces, 14 millones de plantas acuáticas, otro tanto de moluscos y 4 millones de crustáceos. La investigación científica ha ido en paralelo a la producción acuícola y en particular, en el caso de los peces, esta se ha beneficiado, de manera importante, de los estudios en biotecnología y biología molecular de las dos últimas décadas. Estos, en particular, han permitido profundizar, aun más, en el conocimiento e implementar nuevas aplicaciones en reproducción de peces. Todos estos hechos justifican, y en consideración de la enorme información acumulada al respecto, que el presente libro haya concentrado su temática solo a la reproducción de los peces. Así mismo, la diversidad de los temas se ha incrementado de manera muy notable por lo que ha sido necesario solicitar la colaboración de distintos especialistas para llevar a cabo revisiones actualizadas de los avances más importantes en materia de reproducción de peces. Esto ha dado lugar al desarrollo de 10 tópicos diferentes que aparecen reflejados en los capítulos que componen el presente libro.

Uno de los aspectos más importantes y menos conocidos de la reproducción es saber cómo se integra la información ambiental en el cerebro de los peces y cómo se realiza su transducción en señales neuronales y neuroendócrinas, capaces de modificar otras estructuras y hormonas implicadas en el proceso reproductor. En este sentido los avances han sido espectaculares. Por poner un ejemplo, se han descrito hasta 6 isoformas de GnRH específicas de los teleósteos. Esta es una neurohormona clave para la síntesis y liberación de las gonadotrofinas hipofisarias y por tanto, esencial para la iniciación y mantenimiento del eje reproductor. Se conocen algunas de las funciones de sus diferen-



tes isoformas, pero muchas están aún por definir. Ante tal avalancha de nuevos conocimientos en neuroendocrinología, era necesario dedicar un capítulo al tema: «**Cerebro y reproducción de peces: bases neuronales y neuro-endócrinas**» que ha sido desarrollado por el Dr. José Antonio Muñoz Cueto del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz.

IncurSIONANDO un poco más en la ruta del eje cerebro-hipófisis-gónadas, también era precisa una actualización, en profundidad, de las hormonas que rigen la función reproductora, a nivel de la hipófisis y de las gónadas, por su entronque directo con un aspecto más aplicado de esta función en cautividad. En estos últimos años se han clonado la FSH y la LH y sus respectivos receptores en varias especies de teleósteos y entre otros avances, se han desarrollando inmunoensayos específicos que han permitido estudiar la función reproductora de una manera más adecuada y precisa. Además, muchos de los mecanismos que regulan la gametogenesis de los teleósteos han sido desvelados gracias a resultados, muy exactos, obtenidos a través de la aplicación de las técnicas de biología molecular. En consecuencia, los conocimientos e interrogantes que se tenía de todos estos procesos en la década de los 80, en la actualidad, han alcanzado niveles óptimos de comprensión generando respuestas y soluciones prácticas a las preguntas planteadas desde entonces. Por ello se ha dedicado otro capítulo a este importante aspecto. La Dra. Silvia Zanuy y sus colaboradores del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal-CSIC en Castellón, han desarrollado el capítulo titulado: «**La regulación y control hormonal del proceso reproductor de los teleosteos**», con la finalidad de presentar una visión más actualizada de este tema.

El proceso reproductor, básicamente, está compuesto por ritmicidades hormonales diarias y estacionales que están estrechamente acopladas con variaciones periódicas ambientales como la luz y la temperatura. Los científicos, desde hace mucho tiempo, se plantean preguntas tales como: ¿Cuáles son los mecanismos de acción de los parámetros ambientales sobre los ritmos endógenos de reproducción?, ¿Cómo actúan los factores ambientales sobre la periodicidad de los ciclos sexuales de los peces?, ¿Se puede inhibir o retrasar el inicio de la pubertad o del proceso reproductor de los peces por manipulación de la luz?, ¿Que im-



plicaciones tiene toda esta manipulación ambiental sobre la acuicultura? El Dr. M. Carrillo y sus colaboradores del Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal-CSIC en Castellón, han intentado responder a todos estos interrogantes desarrollando el capítulo: **«El control ambiental de la reproducción de los peces con especial referencia al control del ciclo sexual, de la pubertad y de la precocidad»**.

Uno de los aspectos largo tiempo ignorado en Acuicultura, a pesar de su importancia teórica y aplicada, ha sido la determinación y diferenciación sexual en los peces. Estos parámetros, de naturaleza demográfica, han sido los responsables de la proporción de sexos en las poblaciones condicionando su estructura y su capacidad reproductora. En consecuencia éstos, por derecho propio, estarían implicados en la supervivencia de las especies. El estudio de la determinación y diferenciación sexual se ha convertido en un área muy activa de investigación y el Dr. Francesc Piferrer del Instituto de Ciencias del Mar del CSIC de Barcelona en el capítulo: **«Determinación y diferenciación sexual en los peces»**, presenta una visión de conjunto, de este importante tema. Este capítulo busca respuestas a numerosos interrogantes entre los cuales podríamos citar: ¿Como influye el medio ambiente en la proporción de sexos?, ¿Que genes están implicados en ello?, ¿Cómo se aprovecha la acuicultura de la ventaja del dimorfismo sexual de las especies?.

Una adecuada alimentación, administrada a los reproductores, influye directamente sobre la fisiología y regulación hormonal del animal e interviene, de manera directa, sobre la calidad y cantidad de huevos y larvas producidos. Además, por su aplicación práctica, es muy importante determinar el tiempo necesario para que la dieta influya sobre la calidad de las puestas. Esta área de conocimiento, ubicada en la interfase nutrición-reproducción, requería de una visión conjunta, acerca de la influencia de los componentes nutricionales de las dietas, la tasa de ingesta y la duración del período de alimentación sobre etapas tempranas de desarrollo de huevos y larvas de los peces. Los Drs. Hernández Palacios y Marisol Izquierdo del Grupo de Investigación de Acuicultura del Instituto Canario de Ciencias Marinas y de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria (ICCM-ULPGC) en Gran Canaria, abordan este reto con un capítulo sobre: **«Efectos de la dieta de los reproductores sobre la puesta»** en el que desarrollan todos estos aspectos.



Los estudios de los mecanismos endocrinos que controlan la reproducción de los peces, han generado la información necesaria para desarrollar protocolos de manipulación ambiental y hormonal para inducir la puesta en cautividad. Un mecanismo directamente implicado en la supervivencia de huevos y embriones es el de la maduración, hidratación y ovulación del oocito. A pesar de su potencial importancia para la acuicultura, en aspectos tales como la evaluación de la viabilidad de los huevos o la criopreservación de huevos y embriones, se conoce poco acerca de las bases moleculares de este mecanismo. El Dr. Joan Cerdá, del laboratorio IRTA-Instituto de Ciencias del Mar de Barcelona presenta una revisión actual en el capítulo titulado: **«Mecanismos moleculares durante la maduración y ovulación del oocito de teleosteos: avances recientes y su aplicación en acuicultura»**.

La capacidad de suspender la actividad celular del germoplasma durante un tiempo indefinido aplicando temperaturas bajas y lograr una posterior reanimación, es una técnica de extraordinario interés para el manejo de la reproducción, la conservación de la biodiversidad y el mantenimiento de variedades de especial valor biotecnológico en peces. La Dra. M.^a Paz Herráez del Departamento de Biología Molecular de la Universidad de León en el capítulo: **«Criopreservación de gametos y embriones»**, plantea los fundamentos de la criopreservación celular y sus aplicaciones a la reproducción de peces. Este capítulo proporciona protocolos de inseminación artificial, así como los avances conseguidos en la congelación de embriones, ovocitos y blastómeros. Todo ello enmarcado en un área de un enorme potencial biotecnológico.

El desarrollo imparable de las actividades humanas ha llevado parejo problemas de contaminación ambiental y acumulación de sustancias químicas que, junto con las producidas por la naturaleza, son capaces de interaccionar con los sistemas endocrinos de los peces. Ello altera su homeostasis corporal e incide negativamente sobre el crecimiento, el desarrollo sexual y el comportamiento reproductor. El Dr. José María Navas, del Departamento de Medio Ambiente del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) presenta un capítulo sobre: **«Los perturbadores endocrinos y sus posibles efectos en la reproducción de peces cultivados»**. Esta revisión profundiza



en las alteraciones fisiológicas que subyacen en el fenómeno de la disrupción endocrina, centrándose en los mecanismos de actuación de los diferentes disruptores endocrinos y su posible incidencia sobre las explotaciones acuícolas.

Uno de los grandes retos a los que se ha tenido que enfrentar la investigación acuícola es el de la diversificación, con el consiguiente incremento de nuevas especies cultivadas de las que prácticamente, se desconocía su biología reproductiva. Para ser eficaz, todo sistema de producción debe disponer de unos conocimientos previos acerca de los patrones y mecanismos reproductores de las nuevas especies que se pretenden cultivar. Por otro lado, era preciso el punto de vista del profesional de los cultivos, tanto sobre la importancia de esta diversificación sobre los mismos, como a que problemas prácticos se enfrenta. Estas han sido algunas de las razones por las que se ha incluido el capítulo: «**Relevancia de la reproducción en la diversificación de la piscicultura marina en España**» escrito por el Dr. José Pedro Cañabate del Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) del centro El Toruño (Junta de Andalucía).

El desarrollo actual de la acuicultura Española y los vínculos históricos establecidos con los países iberoamericanos, permiten establecer relaciones científicas estratégicas de colaboración internacional con todos ellos. Latinoamérica presenta unas condiciones únicas y privilegiadas para desarrollar cultivos de peces que, además al ser muy diversos, tienen estrategias reproductoras muy diferentes a las de las especies que se cultivan en España. Así por ejemplo, el crecimiento de la producción acuícola en peces, crustáceos y moluscos, en los países en vías de desarrollo, ha sido superior al registrado en los desarrollados, con un incremento del 10,2% desde 1970 frente al 3,9 de los países desarrollados. Además, la mayor producción acuícola de los países en desarrollo es en peces omnívoros/herbívoros y en especies que se alimentan por filtración. En cambio, en los países desarrollados, casi las $\frac{3}{4}$ partes de la producción piscícola es de especies carnívoras. A pesar de estas enormes diferencias entre las especies cultivadas en España y en Latinoamérica, seguramente es factible aplicar conocimientos desarrollados en especies modelo en España a especies nativas de Latinoamérica. Esto puede dar como resultado el desarrollo de estudios de

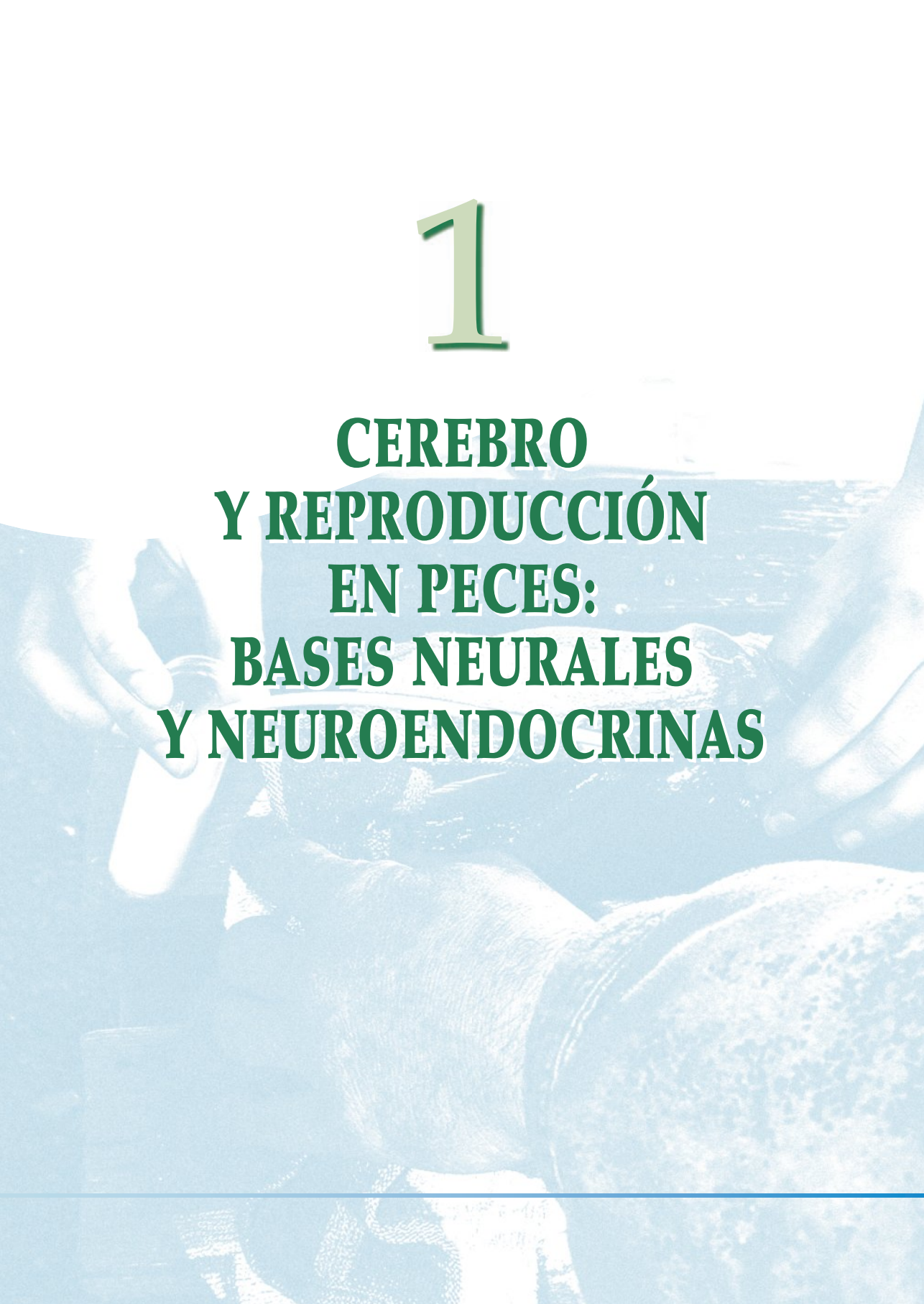


fisiología y endocrinología comparada que previsiblemente tendrán un fuerte impacto en acuicultura. Por ello, previamente, es importante conocer cual es la situación actual de la reproducción de peces en Latinoamérica y en cierta manera, disponer de un inventario de especies potenciales para los cultivos. Los Doctores Vicente Gracia López, del Centro de Investigaciones del Noroeste, S.C. (CIBNOR) de Baja California (México) e Ivan Valdebenito Isler, de la Escuela de Acuicultura, Facultad de Recursos Naturales de la Universidad Católica de Temuco (Chile), han respondido a esta demanda con un capítulo sobre: **«Reproducción de peces marinos y de agua dulce en Latinoamérica»**. Estos autores señalan una producción escasa y fluctuante de peces marinos y a pesar de disponer de información científica sobre la reproducción de, al menos ocho familias de peces, ésta todavía no se ha traducido en producción industrial. Esta situación contrasta con las especies de agua dulce, en particular en los salmónidos, con una producción de más de 600.000 toneladas, en los que se han implementado prácticamente todas las tecnologías de la reproducción, desde la inducción a la puesta a la crio-preservación de gametos.



1

CEREBRO Y REPRODUCCIÓN EN PECES: BASES NEURALES Y NEUROENDOCRINAS





CEREBRO Y REPRODUCCIÓN EN PECES: BASES NEURALES Y NEUROENDOCRINAS

José Antonio Muñoz Cueto

Departamento de Biología.
Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales.
Universidad de Cádiz

Resumen

La reproducción en peces es un proceso de enorme interés, tanto básico como aplicado, dada la posición filogenética que ocupan los peces en la escala de vertebrados y la relevancia de este evento para la acuicultura. Este proceso fisiológico, de marcado carácter estacional, es el resultado de la integración de la información ambiental por sistemas sensoriales específicos y su transducción en una cascada hormonal que tiene lugar a lo largo del eje pineal-cerebro-hipófisis-gónada, y que tiene por objeto que la reproducción tenga lugar en el momento más favorable para la supervivencia de la progenie. El órgano pineal y el cerebro desempeñan un papel relevante en la actividad del eje reproductivo ya que desarrollan funciones receptoras, integradoras y efectoras. En este capítulo abordaremos el papel desempeñado por el órgano pineal y el cerebro en la integración de la información ambiental y en su transducción en una serie de señales neurales y neuroendocrinas que modulan la actividad y secreción de otras estructuras y hormonas implicadas en el proceso reproductivo.

Abstract

Fish reproduction is a physiologically relevant process with both basic and practical interest given the high number of fish species, their key position



in vertebrate phylogeny and their increasing importance for Aquaculture. Seasonal reproduction in fish is the consequence of the adequate integration of environmental cues by specific sensory systems and their transduction into a hormonal cascade throughout the pineal-brain-pituitary-gonadal axis. As a result, this event occurs in the moment of the year being most favorable for the survival of the progeny. The pineal organ and the brain play a crucial role within the reproductive axis since they exhibit receptor, integrating and effectors functions. In this chapter, we will review the role played by the pineal organ and the brain in the integration of the environmental information and its transduction into neural and neuroendocrine signals that modulate the activity and secretion of other structures and hormones involved in the reproductive process.

1.1. INTRODUCCIÓN

Un reto de la acuicultura es la diversificación y la reproducción controlada de nuevas especies de interés comercial. Sin embargo, en la mayoría de los casos la reproducción en cautividad de estas nuevas especies sigue siendo un proceso poco controlado y aleatorio en gran parte de las instalaciones piscícolas. Estos problemas son, en parte, la consecuencia de alteraciones en las condiciones ambientales (ciclos de luz y temperatura, etc) a las que se hallan sometidos los animales en cultivo, y que en muchos casos difieren sensiblemente de las condiciones que encuentran en el medio natural. Si a esto le unimos los problemas asociados al desarrollo (viabilidad, malformaciones), el manejo (estrés, patologías) y la alimentación (en muchos casos los piensos no están del todo equilibrados para la especie en cuestión), resulta fácil comprender la dificultad que supone incorporar nuevas especies para su explotación en acuicultura. Todas estas alteraciones afectan la evolución normal del proceso reproductivo porque perturban el sistema endocrino a distintos niveles del eje pineal-cerebro-hipófisis-gónada (Figura 1). Por ello, el esclarecimiento de los mecanismos de integración de la información ambiental y el conocimiento de los eventos endocrinos y neuroendocrinos que regulan la reproducción representan aspectos cruciales para la Acuicultura de estas especies, ya

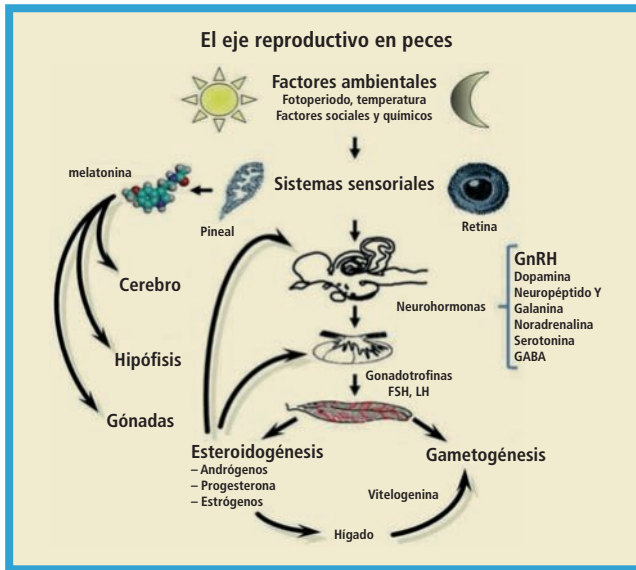


FIGURA 1.
Esquema representativo del eje pineal-cerebro-hipófisis-gónada que gobierna el proceso reproductivo en peces.

que pueden favorecer notablemente el control de su ciclo reproductivo y permitir resolver problemas cotidianos que se presentan en la práctica acuícola.

El órgano pineal y el cerebro desempeñan un papel relevante en la actividad del eje reproductivo ya que poseen funciones receptoras, integradoras y efectoras. En este capítulo abordaremos el papel que desempeñan el órgano pineal y el cerebro en la integración de la información ambiental y en su transducción en una serie de señales neurales y neuroendocrinas que modulan la actividad y secreción de otras estructuras y hormonas implicadas en el proceso reproductivo.

1.2. EL ÓRGANO PINEAL: INTEGRACIÓN NEURAL Y NEUROENDOCRINA DE LA INFORMACIÓN AMBIENTAL

La reproducción de los peces es un proceso de marcado carácter rítmico, que se encuentra regulado por factores ambientales cíclicos como el fotoperiodo y la temperatura. Así, en nuestras latitudes los animales están expuestos en el medio natural a los cambios diarios y



estacionales de los ciclos de luz-oscuridad (días más largos en verano, días más cortos en inviernos, y días de duración intermedia en primavera y otoño) y a los cambios progresivos en la temperatura del agua (aguas más cálidas en verano, aguas más frías en invierno, temperaturas intermedias en primavera y otoño). Estas variaciones en la duración de los días y en la temperatura del agua son periódicas y repetitivas de un año a otro y representan señales muy fiables para los peces. En respuesta a estas variaciones cíclicas, y de forma adaptativa, los animales han seleccionado la época del año que resulta más favorable para la reproducción y la supervivencia de su progenie. Esto hace que algunas especies como la dorada o la lubina se reproduzcan en invierno y que otras como el lenguado se reproduzcan en primavera y, en menor medida, en el otoño.

El conocimiento de los mecanismos que subyacen en el control ambiental de la reproducción tiene no sólo un interés básico sino también un interés aplicado para controlar el proceso reproductivo de peces. Los primeros resultados claros de manipulación fotoperiódica en peces, fueron obtenidos por Hoover (1937). En estos primeros ensayos se comprobó que la exposición de truchas a ciclos comprimidos, más cortos de un año, producía un adelanto del tiempo de las puestas en 3-4 meses con respecto a los animales mantenidos en fotoperiodo natural. Posteriormente estudios realizados por otros autores en varias especies de peces, tales como la dorada (Zohar *et al.*, 1995), la lubina (Carrillo *et al.*, 1995) y el lenguado (Devauchelle *et al.*, 1987; Ramos, 1985), demostraron que las puestas se adelantaban cuando se utilizaban ciclos naturales de luz comprimidos y se atrasaban si los fotoperiodos estacionales se extendían a periodos superiores a un año. Esta modificación estacional del fotoperiodo ha sido una práctica muy habitual desde hace tiempo para adelantar o retrasar las puestas en algunas especies como la trucha (Bromage *et al.*, 2001) y la lubina (Carrillo *et al.*, 1993; Zanuy *et al.*, 1995). Una revisión detallada de estos estudios se puede encontrar en el capítulo dedicado al control ambiental de la pubertad y de los ciclos reproductores elaborado por Manuel Carrillo en este libro.

Pero para que la reproducción tenga éxito, los individuos no sólo deben sincronizarse con las variaciones de los factores ambientales sino que es preciso que se produzca también una sincronización de los repro-



ductores entre sí, de forma que maduren simultáneamente. El desarrollo adecuado de todos estos procesos requiere múltiples y complejas interacciones que tienen lugar a lo largo del **eje pineal-cerebro-hipófisis-gónada** (Figura 1). Para ello, los individuos disponen de sistemas sensoriales y receptores específicos que perciben los estímulos ambientales (fotoperíodo, temperatura, etc.) y sociales (presencia de otros individuos, densidad de población, proporción de sexos, etc). Como veremos en este capítulo, el órgano pineal, una estructura neural con capacidad secretora, desempeña en peces un papel muy importante en la percepción de la información del fotoperíodo y la temperatura y en la codificación de esta información en señales nerviosas (neurotransmisores) y neuroendocrinas (melatonina) que permiten la sincronización ambiental de numerosos procesos rítmicos, entre ellos la reproducción. Esta información suministrada por el órgano pineal debe alcanzar de forma directa o indirecta el hipotálamo y la hipófisis, para modular la síntesis de factores reguladores hipotalámicos y gonadotrofinas hipofisiarias, las cuales dirigen los ritmos de desarrollo gonadal y la reproducción.

En vertebrados como los agnatos, los peces y los anfibios, la glándula pineal es un órgano fotosensible que posee verdaderos pinealocitos fotorreceptores y, en el curso de la evolución, estos pinealocitos han perdido progresivamente sus propiedades fotorreceptoras (Falcón, 1999; Ekström y Meissl, 2003). Así, en mamíferos la captación de la información luminosa reside exclusivamente en la retina, ya que es la estructura que presenta células fotorreceptoras (conos y bastones). Esta información de la retina llega al cerebro a través de un tracto retino-hipotalámico y alcanza diversos núcleos nerviosos, entre ellos el núcleo supraquiasmático, donde se localiza el marcapasos central que controla los ritmos biológicos. A través de una serie de relevos neuronales que implican a poblaciones celulares de la medula espinal, esta información de la luz llega a la glándula pineal, que responde secretando melatonina de forma rítmica (secreción nocturna) para sincronizar numerosos ritmos biológicos (Collin *et al.*, 1989). Los reptiles y aves presentan una organización intermedia, en los cuales tanto la ruta intracraneal como el tracto retino-hipotalámico median en el acceso de la información sobre el fotoperíodo hasta la glándula pineal (Collin *et al.*, 1989; Falcón, 1999).



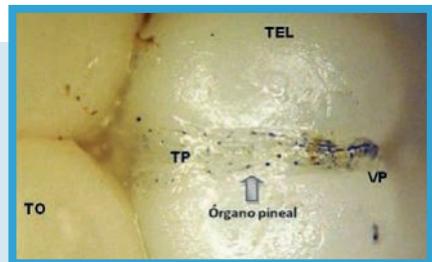
1.2.1. Organización anatómica y tipos celulares

El órgano pineal de peces es una estructura fotorreceptora alargada que se localiza en la línea media, entre el telencéfalo y el techo óptico (Ekström y Meissl, 1997; Falcón *et al.*, 2007b). Consta de un tallo proximal estrecho y de una vesícula distal mucho más expandida (Figura 2). El tallo pineal se encuentra unido al techo del diencéfalo mediante un tracto de fibras que contiene las proyecciones aferentes y eferentes del órgano pineal. La pared epitelial de la vesícula pineal es de espesor variable, se encuentra muy vascularizada y encierra un lumen muy replegado delimitado por pinealocitos fotorreceptores, si bien en la pared pineal se observan también neuronas, células de apariencia glial y células endoteliales. El órgano pineal de peces suele adoptar una disposición más o menos vertical y se ancla mediante tejido conjuntivo al cartílago presente justo debajo de una ventana pineal que permite el paso de la luz ya que posee menos melanóforos que el resto de la piel del cráneo (Figura 3).

La naturaleza química de los elementos celulares que componen el órgano pineal de peces ha sido puesta de manifiesto mediante técnicas citoquímicas, inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ*, que han permitido identificar tanto las células secretoras de melatonina como las células fotorreceptoras y las células gliales (Ekström y Meissl, 1997; Falcón *et al.*, 2007b). Dado que la melatonina es altamente difusible y no se acumula en los pinealocitos, las células secretoras de melatonina han sido localizadas mediante el uso de anticuerpos dirigidos frente a la serotonina, un precursor en la síntesis de melatonina, o frente a la enzima última en la síntesis de melatonina, la hidroxindol-O-metiltransferasa o HIOMT (Falcón *et al.*, 1994; Ekström y Meissl, 1997). A su

FIGURA 2.

El órgano pineal de la lubina. Visión dorsal. TEL, telencéfalo; TO, techo óptico; TP, tallo pineal; VP, vesícula pineal (A. Servili).



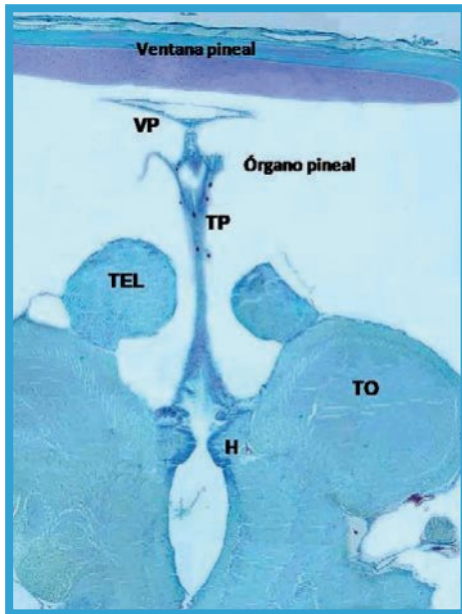


FIGURA 3.

Sección histológica transversal del órgano pineal de la lubina en la que se observa la vesícula pineal anclada en la base de la ventana pineal. H, habénula; TEL, telencéfalo; TO, techo óptico; TP, tallo pineal; VP, vesícula pineal (P. Herrera-Pérez).

vez, las células fotorreceptoras han sido evidenciadas mediante el uso de diferentes anticuerpos anti-rodopsina y anti-cono opsina. Recientemente, además de los fotopigmentos de tipo rodopsina se ha puesto de manifiesto en la pineal de peces la presencia de fotopigmentos de tipo cono opsina con distinta fotosensibilidad (verde y ultravioleta), así como dos nuevos tipos de opsinas denominadas «pinopsina» y «opsina ancestral de vertebrados», que se expresan en células diferentes de los conos y los bastones (Fejér *et al.*, 1997; Forsell *et al.*, 2001; Philp *et al.*, 2000a, 2000b). En cualquier caso, los estudios inmunohistoquímicos han permitido determinar que las células secretoras de melatonina y las células fotorreceptoras se distribuyen tanto en el tallo como en la vesícula pineal (Figura 4) y que una importante proporción de células HIOMT- o serotonina-positivas (secretoras de melatonina) tienen capacidad fotorreceptora directa ya que también presentan inmunorreactividad frente a los anticuerpos anti-opsina (Falcón *et al.*, 2007b).

El análisis ultraestructural mediante microscopía electrónica ha permitido identificar las características celulares y sub-celulares del órgano pineal de peces (Ekström y Meissl, 1997; Falcón *et al.*, 2007b). Las célu-

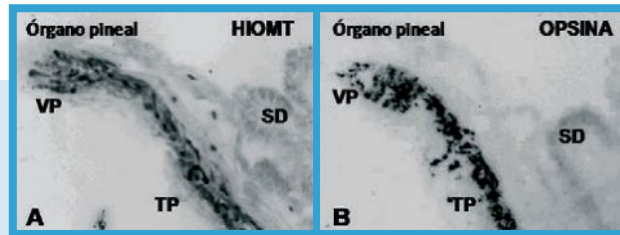


FIGURA 4.

Localización inmunohistoquímica de células HIOMT-inmunorreactivas secretoras de melatonina (A) y células fotorreceptoras opsina-inmunorreactivas (B) en el órgano pineal del lenguado. SD, saco dorsal; TP, tallo pineal; VP, vesícula pineal (F. Confente).

las fotorreceptoras presentan una clara polarización, con un segmento externo en posición apical que se caracteriza por la presencia de lamelas membranosas apiladas, que contienen los fotopigmentos (Figura 5). Este segmento externo se encuentra unido al segmento interno por una estructura ciliar con la organización característica $9 + 0$. El segmento interno es rico en mitocondrias y está unido a la porción medial, caracterizada por la presencia de un núcleo con un nucleolo prominente. El polo basal contiene la región de contactos sinápticos entre las células fotorreceptoras y las neuronas de segundo orden, que tiene lugar, de forma mayoritaria sobre las dendritas de las mismas. La mayoría de los axones de estas neuronas de segundo orden son axones amielínicos, si bien en ocasiones se observa en el órgano pineal de peces la presencia de axones mielínicos. Asimismo, se observa la presencia de uniones estrechas entre células pineales lo que indica la existencia de acoplamiento eléctrico entre poblaciones celulares, probablemente para emitir una respuesta coordinada (Ekström y Meissl, 1997).

1.2.2. Conexiones neurales

El órgano pineal de peces se encuentra conectado de forma bidireccional con el cerebro a través de proyecciones eferentes que salen del órgano pineal, y de proyecciones aferentes que llegan al órgano pineal. Estas conexiones han sido dilucidadas en lampreas, elasmos-

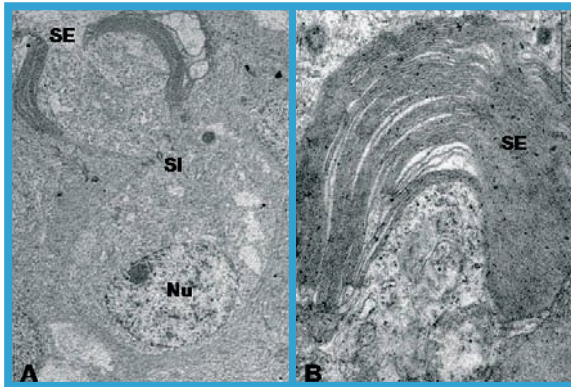


FIGURA 5.

A. Célula fotorreceptora del órgano pineal de la lubina. En B se muestra un detalle del segmento externo en el que se visualizan las lamelas membranas que contienen los fotopigmentos. SE, segmento externo; SI, segmento interno; Nu, núcleo (P. Herrera-Pérez).

branquios y peces teleósteos mediante el uso de marcadores retrógrados y anterógrados de trazado neuronal tales como la peróxidasa de rábano, lisina-cobalto, Dil, etc (Ekström *et al.*, 1994; Jiménez *et al.*, 1995; Yáñez y Anadón, 1998; Pombal *et al.*, 1999; Mandado *et al.*, 2001). Las proyecciones eferentes del órgano pineal pueden considerarse como una señal neural de salida de la información del fotoperiodo hacia áreas centrales del sistema nervioso. Estos estudios han revelado la existencia de un tracto eferente desde el tallo pineal hacia la porción más lateral de la habénula y hacia el tálamo ventral. Este tracto de fibras alcanza la comisura posterior, progresa a través del fascículo retroflexo y envía terminales nerviosas al tálamo dorsal, el pretecto periventricular, el área pretectal central, el tubérculo posterior, el núcleo tuberal posterior y el sinencéfalo dorsal. A su vez, el órgano pineal de peces recibe proyecciones centrales originadas en neuronas que, en gran medida, se localizan en las mismas áreas inervadas por las proyecciones eferentes del órgano pineal, esto es, la eminencia talámica, la habénula, el núcleo ventromedial del tálamo ventral, el tálamo dorsal, el pretecto periventricular, la comisura posterior, el tubérculo posterior y el sinencéfalo dorsal (Ekström *et al.*, 1994; Jiménez *et al.*, 1995; Yáñez y Anadón, 1998; Pombal *et al.*, 1999; Mandado *et al.*, 2001). Muchas de estas áreas se solapan con regiones cerebrales que aparecen también conectadas con la retina (tálamo ventral y dorsal, área pretectal, tubérculo posterior), lo que denota su importancia en la integración de la información del fotoperiodo (Figura 6). En cambio,



otras áreas como la región del nervio terminal, el área preóptica o el techo óptico sólo presentan conexiones con la retina. En el último capítulo de esta revisión se tratarán de esbozar posibles interacciones de estas inervaciones pineales y/o retinianas con centros neuroendocrinos que han sido implicados de forma directa en el control del proceso reproductivo en peces.

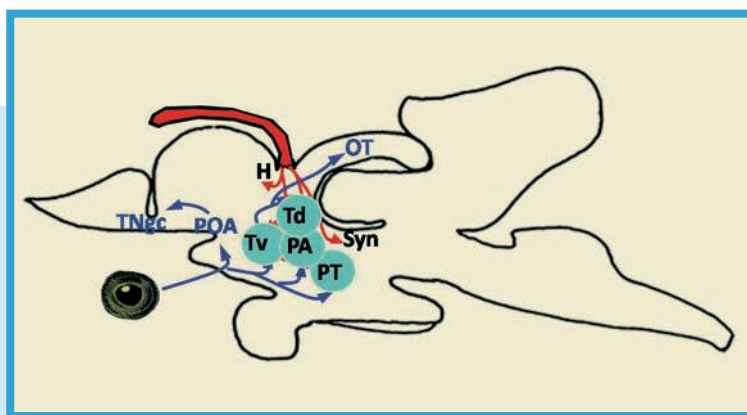


FIGURA 6.

Proyecciones del órgano pineal (en rojo) y la retina (en azul) de la lubina. Las regiones enmarcadas en círculos se corresponden con áreas que reciben una inervación desde ambas estructuras fotorreceptoras. H, habénula; OT, techo óptico; PA, área preóptica; POA, área preóptica; PT, tubérculo posterior; Syn, sinencéfalo; Td, tálamo dorsal; TNgc, células ganglionares del nervio terminal; Tv, tálamo ventral (A. Servili).

1.2.3. Secreción de melatonina y efectos sobre el eje reproductivo

En peces, al igual que sucede en mamíferos, la información del fotoperiodo es transducida por el órgano pineal en una señal neuroendocrina que se corresponde con la hormona melatonina (Reiter, 1991). Esta hormona, que es secretada también por la retina aunque en menor medida, parece mediar la mayoría de las actividades rítmicas circadianas y estacionales de los vertebrados, si bien los mecanismos precisos que subyacen a estas acciones son, en su mayoría, descono-



cidos. Hasta la fecha se han descrito numerosos ritmos de producción de melatonina tanto en especies dulceacuícolas como en especies marinas (Zachmann *et al.*, 1992; Sánchez-Vázquez *et al.*, 1997; Bromage *et al.*, 2001; Vera *et al.*, 2007). En todas ellas, los niveles de melatonina plasmática se elevan durante la noche y descienden durante el día. Estos cambios cíclicos diarios en la secreción de melatonina son el resultado de la expresión y la actividad rítmica de la enzima serotonina N-acetiltransferasa (NAT) pineal, la enzima clave en la biosíntesis de melatonina (Ekström y Meissl, 1997; Falcón *et al.*, 2007b). Pero estos ritmos de melatonina no solo suministran información acerca de la hora del día, sino que en animales poiquiloterms esta hormona experimenta también variaciones estacionales relacionadas con la duración de la noche y la temperatura del agua (Figura 7), que informan al animal de la época del año en que se encuentra (Reiter, 1993). Así, el carpín dorado presenta valores nocturnos de melatonina más elevados a temperaturas altas que a temperaturas bajas (Iigo y Aida, 1995) y evidencias similares se han obtenido en el salmón o la lubina con valores

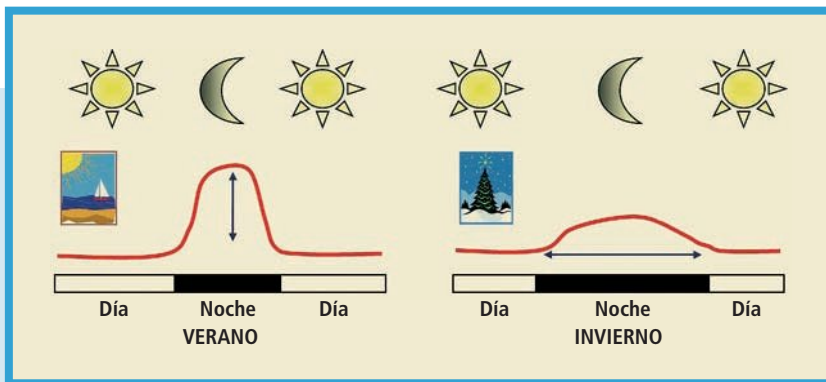


FIGURA 7.

Esquema representativo de los ritmos diarios y estacionales de secreción de melatonina. La melatonina representa una señal diaria ya que se secreta a concentraciones más elevadas durante la noche. Asimismo, representa una señal estacional, ya que la duración de las noches (y por tanto la secreción de melatonina) varía a lo largo del año. En poiquiloterms, la temperatura también regula la amplitud del ritmo de secreción de melatonina, siendo mayor a temperaturas elevadas.



máximos de melatonina nocturna en los meses cálidos (Randall *et al.*, 1995; García-Allegue *et al.*, 2001).

En mamíferos, la síntesis de melatonina está bajo el control de estímulos noradrenérgicos procedentes de los ganglios cervicales superiores y está gobernada de manera circadiana por el *núcleo supraquiasmático* del hipotálamo, que recibe proyecciones directas desde la retina y representa el reloj o marcapasos central (Ralph *et al.*, 1990; Klein *et al.*, 1991). Sin embargo, la naturaleza y localización del marcapasos cerebral de peces no está aún esclarecida. En algunas especies de peces, especialmente de la familia de los salmónidos, el patrón de secreción de melatonina se encuentra regulado directamente por los ciclos día/noche, careciendo aparentemente de ritmos endógenos de secreción de melatonina (Gern y Greenhouse, 1988; Coon *et al.*, 1998). Por el contrario, en otras especies de teleósteos como *Carassius auratus* (Kezuka *et al.*, 1989), *Catostomus commersoni* (Zachmann *et al.*, 1992), *Esox lucius* (Falcón *et al.*, 1989; Coon *et al.*, 1998) o *Danio rerio* (Cahill, 1996), las variaciones diarias en la producción de melatonina parecen estar determinadas por relojes endógenos intrapineales, ya que los animales continúan produciendo melatonina de forma rítmica en condiciones de oscuridad constante, si bien el periodo puede ser ligeramente superior o inferior a 24 horas (Bromage *et al.*, 2001).

El control fotoperiódico de la reproducción está mediado por el órgano pineal, tal como sugieren los estudios de manipulación del fotoperiodo, de pinealectomía y de administración de melatonina (Fenwick, 1970; Ekström y Meissl, 1997). No obstante, la naturaleza de estos efectos parece variar dependiendo de si los animales son reproductores de días largos (p.e. ciprínidos y peces gato) o de días cortos (p.e. salmónidos). En reproductores de días largos, la pinealectomía estimula la reproducción en invierno (días cortos) mientras que inhibe la reproducción en verano (días largos) y la situación opuesta se ha descrito para reproductores de días cortos (Ekström y Meissl, 1997; Mayer *et al.*, 1997). En resumen, en estos peces el órgano pineal parece ejercer una función estimuladora de la reproducción en fotoperiodos largos, pero un efecto inhibitor en fotoperiodos cortos. Asimismo, existen evidencias que muestran marcados efectos de la pinealectomía y de la administración de melatonina sobre los niveles de gonadotrofinas hipofisarias y/o de hormona liberadora de gonadotro-



finas, que también pueden ser estimuladores o inhibidores según las especies estudiadas (Hontela y Peter, 1995; Khan y Thomas, 1996).

Recientemente, se ha sugerido que la melatonina puede actuar como transductor de las fases lunares en peces, sincronizando cambios hormonales y ciclos reproductores lunares (Rahman *et al.* 2003). Además, se ha descrito la existencia de ritmos diarios de reproducción que refuerzan el importante papel del órgano pineal y la melatonina en la sincronización de las puestas en momentos concretos del día. Así, el carpín dorado ovula normalmente durante la noche, y la pinealectomía determina que la ovulación se produzca durante el día (Popek *et al.*, 1994).

Todas estas evidencias parecen poner de manifiesto una implicación del órgano pineal y la melatonina en la regulación rítmica, tanto diaria como estacional, de la reproducción actuando sobre el eje cerebro-hipofisario, si bien el sustrato neuroanatómico de estas interacciones aún no está del todo esclarecido. En este sentido, la expresión de receptores de melatonina y/o de sitios de unión de ^{125}I -iodomelatonina se ha descrito en áreas cerebrales implicadas en el procesamiento de la información visual y fotoperiódica, así como en áreas conductuales y motoras, pero también en regiones neuroendocrinas como el área preóptica o el hipotálamo (Figura 8) (Ekström y Vanacek, 1992; Ma-

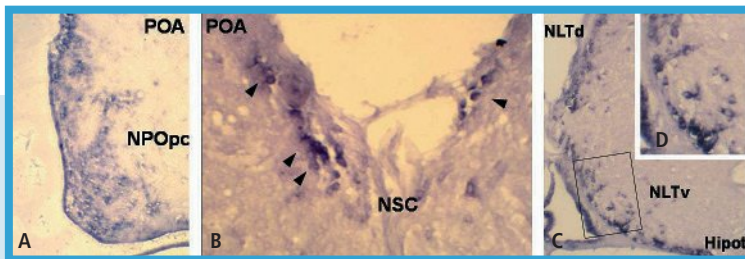


FIGURA 8.

Receptores de melatonina en áreas neuroendocrinas del cerebro de la lubina, evidenciadas mediante hibridación *in situ*. A, Células del núcleo preóptico parvocelular (NPOpc) del área preóptica (POA). B. Células del núcleo supraquiasmático (NSC). C. Células del núcleo lateral tuberal ventral (NLTv) y dorsal (NLtd) del hipotálamo (Hipot). D. Detalle de las células del NLTv (Herrera-Pérez *et al.*, 2007).



zurais *et al.*, 1999; Falcón *et al.*, 2007a; Herrera-Pérez *et al.*, 2007). La melatonina también podría modular las funciones neuroendocrinas y la reproducción actuando de forma directa sobre la hipófisis (Falcón *et al.*, 2007a). Así, tanto en la trucha como en el lucio se ha demostrado mediante PCR la expresión de receptores de melatonina de tipo MT1 y MT2, lo que concuerda con los resultados de binding de ^{125}I -iodomelatonina tanto en secciones de hipófisis como en preparaciones de membranas hipofisarias (Gaildrat y Falcón, 2000; Falcón *et al.*, 2003; Falcón *et al.*, 2007a). No obstante, los resultados obtenidos en relación con la expresión de receptores de melatonina y/o la presencia de sitios de unión de ^{125}I -iodomelatonina en la hipófisis de peces son contradictorios ya que en ocasiones se han puesto en evidencia y en otras no. Esta aparente contradicción puede ser la consecuencia de diferencias en la hora del día, en la estación del año o en el estado reproductivo de los animales cuando se realizaron los experimentos. De hecho, es posible que existan variaciones diarias y estacionales en los receptores de melatonina hipofisarios, como sucede en el cerebro de peces (Gaildrat *et al.*, 1998; Iigo *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2007).

1.3. EL CEREBRO NEUROENDOCRINO

Como se ha indicado anteriormente, el cerebro de peces posee una serie de sistemas intermediarios que integran las informaciones neurales (proyecciones pineales y retinianas) y neuroendocrinas (melatonina) del fotoperiodo y las hacen llegar, de forma directa o indirecta, a sistemas efectores que responden liberando determinadas neurohormonas. Los peces teleósteos carecen de eminencia media y de un sistema que ponga en contacto vascular el hipotálamo con la hipófisis como existe en Tetrápodos, por lo que estas neurohormonas inervan de forma más o menos directa a las células del lóbulo anterior adenohipofisario. Estas neurohormonas modulan la actividad de la hipófisis y desencadenan una serie de cascadas endocrinas que conducen a la reproducción (Kah *et al.*, 1993; Trudeau, 1997). En concreto, estimulan o inhiben la síntesis y secreción de gonadotrofinas hipofisarias (hormona estimulante del folículo y hormona luteinizante), que regulan a su vez la gametogénesis y la esteroidogénesis gonadal, así como otros procesos implicados en la reproducción.

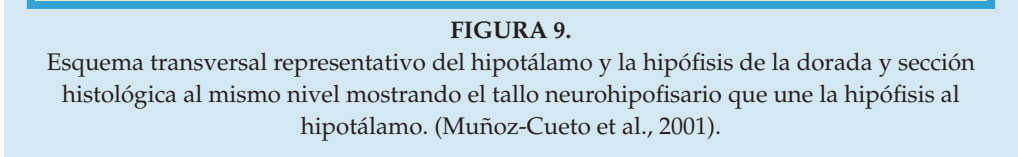


Las funciones de los principales órganos y estructuras endocrinas aparecen muy conservadas en vertebrados. Por ello, los mecanismos que subyacen en el control neuroendocrino de la reproducción son, en esencia, los mismos a lo largo de la escala filogenética. En este sentido, las áreas cerebrales y los factores neurohormonales implicados en la regulación neuroendocrina del proceso reproductivo se hallan también más o menos conservados en vertebrados. En los siguientes apartados analizaremos en detalle la localización de estas áreas hipofisiotróficas en el cerebro de peces, los principales factores neurohormonales implicados en el control de la reproducción y la naturaleza de sus acciones.

1.3.1. Inervación de la hipófisis en peces: áreas hipofisiotróficas y neuroendocrinas implicadas en el control de la reproducción

La actividad y la secreción hormonal en la hipófisis están controladas por una multiplicidad de factores neurohormonales que son sintetizados en poblaciones neuronales concretas del cerebro y son liberados directamente en la hipófisis. El esclarecimiento de la naturaleza y el origen de estas neurohormonas puede proporcionar una información muy relevante sobre como el cerebro controla las funciones adenohipofisarias. Por ello, el conocimiento de la organización neuroanatómica del complejo hipotálamo-hipofisario se antoja crucial para dilucidar estos aspectos.

La hipófisis de peces se encuentra unida al hipotálamo por un tallo fino denominado neurohipófisis, que está constituido por los axones de las células neurosecretoras que penetran en la hipófisis desde el cerebro (Figura 9). Como se indicó con anterioridad, la hipófisis de peces presenta la peculiaridad de carecer del sistema portal (vascular) hipotálamo-hipofisario característico de Tetrápodos. De esta forma, las neurohormonas que controlan la actividad de las distintas células endocrinas de la hipófisis son liberadas desde los terminales neurosecretores de forma más o menos directa en el entorno de las células diana (Batten e Ingleton, 1987). Esta inervación puede, por tanto, considerarse funcionalmente homóloga a la eminencia media de vertebrados terrestres. En algunas especies de peces (salmónidos, anguilas), estos terminales neurosecretores se encuentran separados



Esquema transversal representativo del hipotálamo y la hipófisis de la dorada y sección histológica al mismo nivel mostrando el tallo neurohipofisario que une la hipófisis al hipotálamo. (Muñoz-Cueto et al., 2001).

42



la secreción de gonadotrofinas y sobre el ciclo reproductivo de peces (Kah *et al.*, 1987; 1989; 1992).

Además, la invasión directa de la adenohipófisis de peces ha permitido el uso de técnicas de trazado neuronal para la identificación mediante transporte retrógrado de las áreas cerebrales que inervan la hipófisis. En estos estudios ha sido especialmente útil el uso de un marcador fluorescente como el Dil (1-1'-diocetadecil-3,3,3',3'-tetrametilindo-carbo-cianina), que se transporta retrógradamente a lo largo de las membranas de axones fijados con formaldehído. El empleo del Dil ha permitido identificar las áreas hipofisiotróficas en especies como el carpín dorado (Anglade *et al.*, 1993), en el pez eléctrico, *Apteronotus leptorhynchus* (Johnston y Maler, 1992) o la lubina (García-Robledo y Muñoz-Cueto, datos no publicados). La mayoría de la invasión de la hipófisis procede de neuronas localizadas en núcleos cerebrales del área preóptica (núcleo preóptico periventricular, núcleo preóptico parvicelular, núcleo preóptico magnocelular, núcleo anterior periventricular, núcleo supraquiasmático) y el hipotálamo mediobasal (núcleo lateral tuberal, núcleo anterior tuberal, núcleo posterior periventricular, núcleo del receso lateral, núcleo del receso posterior), las principales regiones neuroendocrinas implicadas en el control de la reproducción en vertebrados. Sin embargo, también se ha descrito la presencia de células hipofisiotróficas en el bulbo olfativo, el telencéfalo ventral, el tálamo o el tegmento del mesencéfalo (Anglade *et al.*, 1993; Kah *et al.*, 1993).

1.3.2. Dos sistemas neuroendocrinos principales dirigen la reproducción en peces

Si bien el número de factores neuroendocrinos que se han relacionado con el control del proceso reproductivo en peces ha ido creciendo progresivamente en las últimas dos décadas, en muchos casos no existe una información detallada de cuándo y cómo se ejercen estos efectos, o si estos efectos son generalizables a todas las especies de peces. Por ello, en este apartado nos centraremos especialmente en aquellos factores cuyas acciones sobre el ciclo reproductivo parecen más claras, en particular la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). En un principio se pensó que este decapeptido era liberado por una única población de neuronas hipofisiotróficas que estimulaban la secreción de gonadotrofi-



nas hipofisarias y que representaba el principal factor desencadenante de una cascada hormonal que controlaba el eje reproductivo. Desde los estudios pioneros de Bernard Breton y colaboradores que mostraron que la GnRH estimulaba la liberación de gonadotrofinas en la carpa (Breton *et al.*, 1972), y de Nancy Sherwood, que caracterizó la primera forma de GnRH en peces, la GnRH de salmón (Sherwood *et al.*, 1983), la investigación de los sistemas GnRH en peces ha cobrado una atención considerable. Este hecho se debe en parte a las aplicaciones prácticas de la GnRH en acuicultura (Zohar y Mylonas, 2001), pero también al hecho de que los peces teleósteos se han revelado como un grupo filogenético de gran interés para comprender la evolución de los genes y los sistemas GnRH en vertebrados. Como veremos a continuación, hoy sabemos que las distintas especies de vertebrados expresan dos o tres formas distintas de GnRH en diferentes tejidos, que pueden ejercer acciones pleiotróficas mediadas por distintos tipos de receptores. Los peces, en general, y los peces teleósteos en particular, han jugado un papel crucial en el establecimiento de estos nuevos conceptos, que han permitido proponer modelos evolutivos sobre la diversificación de funciones de las distintas formas de GnRH (Leithimonier *et al.*, 2004; Guilgur *et al.*, 2006; Kah *et al.*, 2007).

También se describirán en este apartado las acciones de la dopamina y, con posterioridad, las acciones de otros sistemas neuroendocrinos que además de actuar directamente sobre la hipófisis para regular la secreción de gonadotrofinas, modulan la expresión y la actividad de estos dos sistemas neuroendocrinos principales, el sistema GnRH y el sistema dopaminérgico (Peter *et al.*, 1991; Kah *et al.*, 1993; Trudeau, 1997). El último apartado estará centrado en el análisis de dos familias de péptidos recientemente descubiertos como las kisspeptinas o la hormona inhibidora de las gonadotrofinas, que regulan la síntesis y secreción de gonadotrofinas hipofisarias y el proceso reproductivo y representan nuevas vías de estudios en el control neuroendocrino de la reproducción (Parhar *et al.*, 2004; Tsutsui *et al.*, 2007).

1.3.2.1. Hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH)

La existencia de un contacto vascular entre el hipotálamo y la hipófisis se puso de manifiesto en la década de 1930, pero no fue hasta la década de 1940 y 1950 cuando Geoffrey Harris, uno de los pioneros de



la neuroendocrinología, empezó a consolidar el concepto de la regulación neurohumoral de las funciones adenohipofisarias. Este concepto chocó en principio con las corrientes investigadoras que sostenían que las neuronas sólo se comunicaban mediante señales eléctricas y que no inervaban el lóbulo anterior de la adenohipófisis de mamíferos. Los experimentos de Geoffrey Harris permitieron comprobar que la sección del tallo hipofisario interrumpía la ciclicidad ovárica en la rata y que la restitución del sistema portal hipotálamo-hipofisario restauraba esta ciclicidad. Estos estudios abrieron el camino al descubrimiento de los factores cerebrales que se transportaban por este sistema vascular hacia la hipófisis para regular la secreción de gonadotrofinas y el desarrollo gonadal (Donovan y Harris, 1954). Así, en la década de 1970 se produjo el descubrimiento por parte de los grupos del Dres. Roger Guillemin (Francia) y Andrew Schally (Estados Unidos) de un decapeptido del hipotálamo de mamíferos que se llamó LH-RH por su potencia estimuladora de la secreción de hormona luteinizante (Burgus *et al.*, 1971; Matsuo *et al.*, 1971). Posteriormente, se observó que también era capaz de estimular la secreción de hormona estimulante del folículo (FSH), por lo que se denominó de forma genérica GnRH (hormona liberadora de gonadotrofinas).

Pero en realidad, la GnRH es una familia de péptidos con una multiplicidad de isoformas (24 isoformas diferentes) presentes en vertebrados, protocordados e invertebrados (Matsuo *et al.*, 1971; King y Millar, 1982a; King y Millar, 1982b; Sherwood *et al.*, 1983; Ngamvongchon *et al.*, 1992; Lovejoy *et al.*, 1992; Sower *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1994; Powell *et al.*, 1996a; Powell *et al.*, 1996b; Jimenez-Liñan *et al.*, 1997; Carolsfeld *et al.*, 2000; Okubo *et al.*, 2000; Yoo *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Montaner *et al.*, 2001; Iwakoshi *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2002). Estas formas de GnRH han recibido tradicionalmente el nombre de la especie en la que han sido puestas de manifiesto por primera vez, si bien pueden estar presentes en otras especies distintas. Dentro de vertebrados, los peces teleósteos representan el grupo filogenético que expresa un mayor número de variantes de GnRH. Así, tras la identificación de la forma GnRH de salmon (Sherwood *et al.*, 1983), se han purificado y secuenciado otras siete isoformas de GnRH. De estas ocho isoformas de GnRH, seis son específicas de teleósteos: GnRH de salmón (sGnRH;



Sherwood *et al.*, 1983), GnRH de pez gato (cfGnRH; Bogerd *et al.*, 1992; Ngamvongchon *et al.*, 1992), GnRH de dorada (sbGnRH; Powell *et al.*, 1994), GnRH de arenque (hrGnRH; Carolsfeld *et al.*, 2000), GnRH de medaka o pejerrey (mdGnRH, Okubo *et al.*, 2000: pjGnRH, Montaner *et al.*, 2001) y GnRH de corégono (wfGnRH; Adams *et al.*, 2002). Además, los teleósteos expresan la forma GnRH de mamífero (mGnRH; Matsuo *et al.*, 1971) y la forma más extendida de GnRH en la escala filogenética, la GnRH II de pollo (cGnRH-II; Miyamoto *et al.*, 1984), que fueron identificadas por primera vez en peces en la anguila (King *et al.*, 1990) y el carpín dorado (Yu *et al.*, 1988), respectivamente (Figura 10).

Para evitar tanta confusión, y atendiendo al análisis filogenético de las diferentes secuencias obtenidas y a los sitios de expresión de estas formas de GnRH, se ha propuesto una nueva nomenclatura de las dis-

La familia de decapeptidos GnRH										
GnRH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mamífero (m)	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	GlyNH ₂
Pollo-I (c-I)	-	-	-	-	-	-	-	Gln	-	-
Dorada (sb)	-	-	-	-	-	-	-	Ser	-	-
Rana (f)	-	-	-	-	-	-	-	Trp	-	-
Cobaya (gp)	-	Tyr	-	-	-	-	Val	-	-	-
Salmón (s)	-	-	-	-	-	-	Trp	Leu	-	-
Corégono (wh)	-	-	-	-	-	-	Met	Asn	-	-
Pez gato (cf)	-	-	-	-	His	-	-	Asn	-	-
Arenque (hr)	-	-	-	-	His	-	-	Ser	-	-
Tiburón (dg)	-	-	-	-	His	-	Trp	Leu	-	-
Pollo-II (c-II)	-	-	-	-	His	-	Trp	Tyr	-	-
Medaka (md)	-	-	-	-	Phe	-	-	Ser	-	-
Lamprea III (l-III)	-	-	-	-	His	Asp	Trp	Lys	-	-
Lamprea I (l-I)	-	-	Tyr	-	Leu	Glu	Trp	Lys	-	-
Tunicado I (tu-I)	-	-	-	-	Asp	Tyr	Phe	Lys	-	-
Tunicado II (tu-II)	-	-	-	-	Leu	Cys	His	Ala	-	-
Pulpo (oc)	-	-	Phe	-	Asn	-	Trp	His	-	-
	Asn-Tyr									

FIGURA 10.

Secuencias de aminoácidos de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) de vertebrados, protocordados e invertebrados. Se muestran las sustituciones respecto a la primera secuencia GnRH descrita en mamíferos. En rojo se indican las isoformas presentes en peces teleósteos.



tintas formas de GnRH (White *et al.*, 1995; Fernald y White, 1999). Así, la forma GnRH-1 englobaría todas las formas hipofisiotróficas de GnRH (la mayoría de las formas descritas), que se expresan principalmente en el hipotálamo y el área preóptica de vertebrados. La forma GnRH-2 se corresponde con la GnRH II de pollo, que se expresa de forma conservada en el sinencéfalo/mesencéfalo de todos los vertebrados, desde peces hasta mamíferos. La tercera forma de GnRH, GnRH-3, se corresponde con la forma GnRH de salmon, que hasta la fecha sólo se ha identificado de forma concluyente en el cerebro anterior de peces (Figura 11).

Una posibilidad es que esta tercera forma de GnRH surgiese como consecuencia de una duplicación génica que tuvo lugar exclusivamente en peces, con posterioridad a la separación entre peces y vertebrados tetrápodos (Kah *et al.*, 2007). Como los peces óseos primitivos del

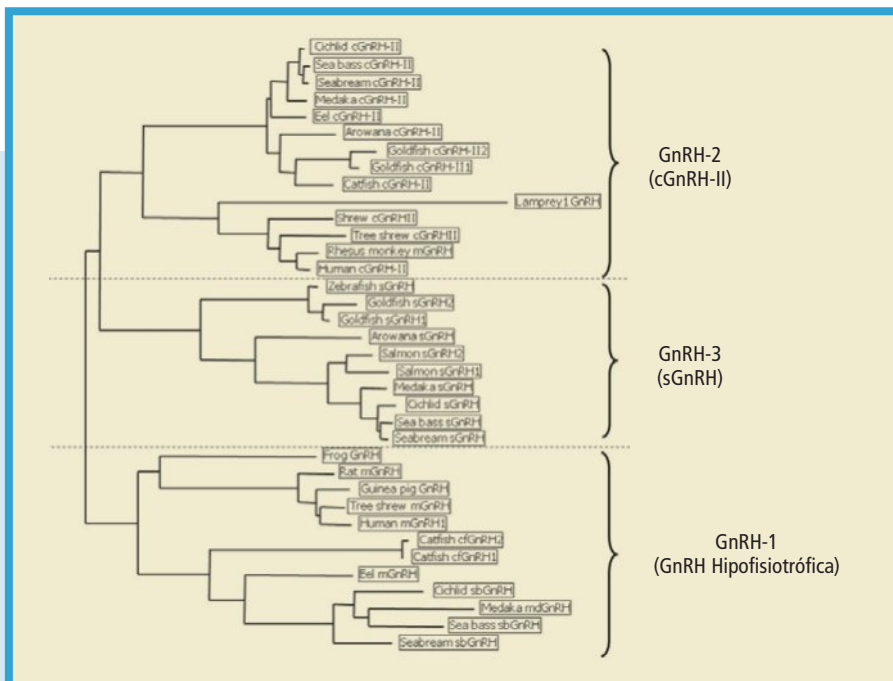


FIGURA 11.

Árbol filogenético mostrando las secuencias GnRH de vertebrados agrupadas en tres ramas correspondientes a las formas GnRH-1, GnRH-2 y GnRH-3. Modificado de Lethimonier *et al.*, 2004.



tipo de los esturiones o *Polypterus* poseen dos formas de GnRH sería de esperar que los teleósteos tuviesen 4 genes GnRH distintos. Así, la forma GnRH-1 al duplicarse pudo dar lugar a las formas GnRH-1 y GnRH-3 actuales, que experimentaron posteriormente un proceso de especialización funcional y una cierta segregación neuroanatómica de sus células y sus proyecciones. En ese caso, sería de esperar que existiesen también dos genes de la forma GnRH-2, pero es posible que uno de los genes GnRH-2 se perdiese poco después de la duplicación, como sucede con el 50 %-80 % de los genes duplicados (Lynch y Force, 2000). Otros estudios filogenéticos y evolutivos sugieren que la duplicación génica que dio lugar a la aparición de las formas GnRH-1 y GnRH-3 es anterior a la separación entre peces y tetrápodos, y posteriormente se ha perdido el gen en vertebrados terrestres, o está presente en los mismos y aún no se ha descrito (Guilgur *et al.*, 2007). Los análisis cromosómicos de las regiones genómicas que rodean a los genes GnRH de humano, pollo, pez cebra, fugu y *Tetraodon* parecen representar un apoyo de esta posible pérdida secundaria de los genes GnRH-3 en la línea de vertebrados tetrápodos (Kuo *et al.* 2005).

1.3.2.1.1. Expresión de dos o tres sistemas GnRH en una misma especie

El patrón básico de distribución de las células GnRH en peces teleósteos sugirió la existencia de dos sistemas principales: un sistema GnRH distribuido a lo largo de la porción ventral del cerebro anterior (nervio terminal, telencéfalo ventral, área preóptica e hipotálamo) y que expresa distintas formas de GnRH según las especies, y otro sistema GnRH en la transición entre el diencéfalo y el mesencéfalo (sinencéfalo), que expresa de forma conservada GnRH-2 (Goos *et al.*, 1985; Kah *et al.*, 1986; Batten *et al.*, 1990; Kah *et al.*, 1991; Rodríguez-Gómez *et al.*, 1999; Kah *et al.*, 2007). Posteriormente, los estudios llevados a cabo en peces del orden perciformes, pusieron de manifiesto que estos teleósteos evolucionados expresaban tres formas distintas de GnRH en el cerebro: sGnRH (GnRH-3), sbGnRH (GnRH-1) y cGnRH-II (GnRH-2) (Powell *et al.*, 1994; White *et al.*, 1995; Gothilf *et al.*, 1996; Senthilkumaran *et al.*, 1999). Estas tres formas de GnRH tenían una clara acción estimuladora sobre la liberación de gonadotrofinas hipofisarias, siendo más potentes los efec-



tos de las formas cGnRH-II y sGnRH respecto a la forma sbGnRH (Zohar *et al.*, 1995). Sin embargo, la forma sbGnRH presentaba unos niveles mucho más elevados en la hipófisis de perciformes, lo que indicaba que esta isoforma era la que desempeñaba de forma fisiológica las funciones hipofisiotróficas (Powell *et al.*, 1994; Holland *et al.*, 1998a; Rodríguez *et al.*, 2000; González-Martínez *et al.*, 2002a). Las formas sGnRH y cGnRH-II parecen desempeñar acciones neurotransmisoras, neuromoduladoras y/o conductuales, si bien sus funciones no están aún del todo esclarecidas (Zohar *et al.*, 1995; Fernald y White, 1999).

Los estudios morfofuncionales parecían demostrar una clara segregación neuroanatómica de los sistemas celulares que expresaban estas tres formas de GnRH en el cerebro de perciformes (Gothilf *et al.* 1996; White y Fernald, 1998). Así, la expresión de la forma GnRH-3 tenía lugar en células de los bulbos olfativos y del nervio terminal; las células del área preóptica expresaban la forma GnRH-1; y por último, la forma GnRH-2 se expresaba en células del sinencéfalo dorsal, en la transición entre el diencefalo y el mesencéfalo (Figura 12) (Gothilf *et al.*, 1996;

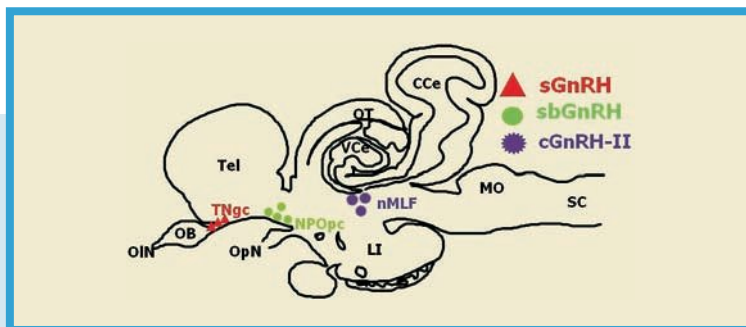


FIGURA 12.

Representación esquemática de la distribución de los tres sistemas GnRH presentes en el cerebro de la dorada. CCe, cuerpo del cerebelo; cGnRH-II, GnRH-II de pollo; LI, lóbulo inferior del hipotálamo; MO, médula oblongata; nMLF, núcleo del fascículo longitudinal medial; NPOpc, núcleo preóptico parvocelular; OB, bulbo olfativo; OIN, nervio olfativo; OpN, nervio óptico; OT, techo óptico; sbGnRH, GnRH de dorada; SC, médula espinal; sGnRH, GnRH de salmón; Tel, telencéfalo; TNgc, células ganglionares del nervio terminal; VCe, válvula del cerebelo. Modificado de Gothilf *et al.*, 1996.



Parhar, 1997). Basándose en esta segregación neuroanatómica y funcional, así como en observaciones obtenidas durante el desarrollo ontogénico, diversos autores propusieron que los tres sistemas GnRH que se expresaban en el cerebro de perciformes se originaban a partir de distintos primordios embrionarios (Parhar, 1997). Así, las neuronas que expresaban GnRH-3 se desarrollarían a partir de la placoda olfativa, mientras que las células GnRH-1 y GnRH-2 lo harían desde primordios del área preóptica basal y del mesencéfalo, respectivamente. Sin embargo, en vertebrados como los anfibios, aves y mamíferos, todas las células GnRH del cerebro anterior se desarrollan a partir de un mismo primordio en la placoda olfativa, mientras que las células GnRH del cerebro medio se originan a partir de otro primordio en la zona germinal del tercer ventrículo (Schwanzel-Fukuda y Pfaff, 1989; Schwanzel-Fukuda, 1999).

En nuestro laboratorio, y en colaboración con los grupos del Dr. Olivier Kah y la Dra. Silvia Zanuy, hemos llevado a cabo una serie de estudios en la lubina (*Dicentrarchus labrax*), que nos permitieron determinar por primera vez en peces que las áreas de expresión de las formas de GnRH del cerebro anterior de perciformes (GnRH-3 y GnRH-1) no están segregadas sino que se solapan desde el bulbo olfativo hasta el área preóptica (Figura 13) (González-Martínez *et al.*, 2001; González-Martínez *et al.*, 2002a). Resultados similares han sido descritos recientemente en el corégono (Vickers *et al.*, 2004), *Cichlasoma dimerus* (Pandolfi *et al.*, 2005), *Micropogonias undulatus* (Mohamed *et al.*, 2005) y la corvina *Argyrosomus regius* (Confente *et al.*, 2007), lo que sugiere que ambas formas de GnRH comparten un origen embrionario y se han originado a partir de un gen ancestral común. Estas consideraciones se ven reforzadas por los estudios de las proyecciones axonales y por los estudios ontogénicos de los distintos sistemas GnRH llevados a cabo en la lubina en el seno de nuestro grupo (Figura 13). Estos estudios demuestran que la forma GnRH-1 y GnRH-3 inervan directamente la hipófisis, mientras que la forma GnRH-2 no envía proyecciones a la misma (González-Martínez *et al.*, 2002a). En esta misma dirección, los estudios ontogénicos llevados a cabo en la lubina han mostrado un origen de ambas formas de GnRH (GnRH-1 y GnRH-3) en los primordios olfativos, y un solapamiento en la expresión de las mismas desde el bulbo olfativo hasta el área preóptica a

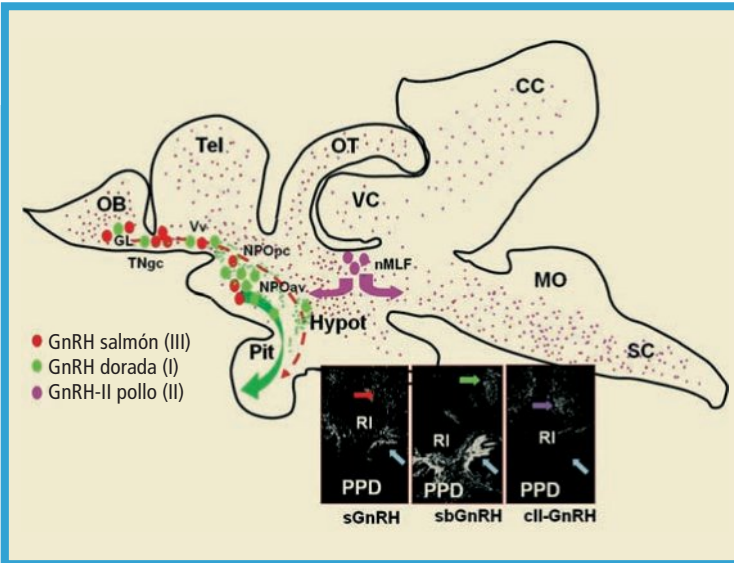


FIGURA 13.

Representación esquemática de la distribución de los tres sistemas GnRH presentes en el cerebro de la lubina obtenida mediante el uso de anticuerpos anti-GAP-preproGnRH. Las fotografías muestran la innervación de la hipófisis de las formas sbGnRH y sGnRH. CC, cuerpo del cerebelo; cGnRH-II, GnRH-II de pollo; GL, capa glomerular del bulbo olfativo; Hypot, hipotálamo; MO, médula oblongata; nMLF, núcleo del fascículo longitudinal medial; NPOav, núcleo preóptico anteroventral; NPOpc, núcleo preóptico parvocelular; OB, bulbo olfativo; OT, techo óptico; Pit, hipófisis; sbGnRH, GnRH de dorada; SC, médula espinal; sGnRH, GnRH de salmón; Tel, telencéfalo; TNgc, células ganglionares del nervio terminal; VC, válvula del cerebelo.

Modificado de González-Martínez et al., 2002a.

lo largo del desarrollo (González-Martínez *et al.*, 2002b; 2004a), lo que apoya la consideración de un origen común para estas formas de GnRH que se expresan en el cerebro anterior. En cambio, la forma GnRH-2 se origina en un primordio del sinencéfalo y presenta un profuso patrón de innervación en el cerebro pero no inerva la hipófisis (González-Martínez *et al.*, 2002a; 2002b; 2004a). Estos resultados se han visto reforzados por los estudios llevados a cabo recientemente por Okubo y colaboradores en medaka usando animales transgénicos, que han puesto de manifies-



to que las células GnRH-1 y GnRH-3 se originan en la región de la placoda olfativa y que ambas poblaciones celulares precisan de la expresión del gen *kal1.1* para su correcta migración hacia posiciones más caudales en el cerebro (Okubo *et al.*, 2006). No obstante, y como en otros perciformes, la forma GnRH-1 es la más abundante en la hipófisis de la lubina (González-Martínez *et al.*, 2002a) y parece representar la forma funcional en la regulación de la síntesis y secreción de gonadotrofinas.

Pero cada vez existen más evidencias que muestran que la expresión de 3 formas distintas de GnRH en el cerebro de teleósteos no está restringida a perciformes y es una característica bastante extendida en teleósteos, ya que también se han detectado 3 isoformas de GnRH distintas en clupeiformes (*Clupea harangus*, Carolsfeld *et al.*, 2000), caraciformes (*Piaractus mesopotamicus*, Powell *et al.*, 1997), salmoniformes (*Coregonus clupeaformis*, Adams *et al.*, 2002), ateriniformes (*Odonthestes bonariensis*, Montaner *et al.*, 2001; Guilgur *et al.*, 2007), sinbranchiformes (*Synbranchus marmoratus*, Somoza *et al.*, 2002), beloniformes (*Oryzias latipes*, Okubo *et al.*, 2000), ciprinodontiformes (*Xiphophorus maculatus*, *Xiphophorus helleri*, Somoza *et al.*, 2002), escorpeniformes (*Sebastes rastrelliger*, Powell *et al.*, 1996a), pleuronectiformes (*Scophthalmus maximus*, Andersson *et al.*, 2001; *Verasper moseri*, Amano *et al.*, 2002) y tetraodontiformes (*Fugu rubripes*, Aparicio *et al.*, 2002, Lethimonier *et al.*, 2004). La presencia de tres genes GnRH ha sido también descrita en otras especies de salmónidos, ciprínidos y silúridos, si bien en estos casos parece ser debido a fenómenos de tetraploidización que han determinado duplicaciones génicas posteriores de los genes GnRH-1 (pez gato), GnRH-2 (carpín dorado) o GnRH-3 (trucha y salmón) (Kah *et al.*, 2007). Aunque la presencia de una tercera forma de GnRH ha sido igualmente sugerida en otros vertebrados, incluidos los humanos (Sherwood *et al.*, 1986; Montaner *et al.*, 1998; Yahalom *et al.*, 1999) su presencia aún no ha podido ser demostrada.

1.3.2.1.2. Acciones fisiológicas de la GnRH

Está descrito de forma profusa en la literatura que la principal acción de la GnRH es la estimulación de la secreción de gonadotrofinas en la hipófisis, y que todas las formas de GnRH son capaces de llevar a cabo estas acciones si bien la potencia varía de unas formas a otras (Zohar *et*



al., 1995). De hecho, la forma de GnRH más abundante en la hipófisis no es siempre la forma más activa, como sucede con la forma sbGnRH (GnRH-1) de perciformes. Estas variaciones en la potencia estimuladora de las distintas isoformas de GnRH parecen estar relacionadas con diferencias en su tasa de degradación enzimática, su vida media en la circulación, su afinidad por los distintos tipos de receptores o su eficiencia en la activación de las rutas intracelulares de segundos mensajeros (Zohar *et al.*, 1995).

Además, no todas las formas de GnRH que se expresan en el cerebro de peces son reguladores endógenos funcionales de la liberación de gonadotrofinas ya que algunas de ellas no alcanzan la hipófisis, como sucede con la forma GnRH-2 de lubina (Figura 13) (González-Martínez *et al.*, 2002a). En peces, estas funciones hipofisiotróficas son llevadas a cabo principalmente por la forma GnRH-1 que se expresa en células del área preóptica (mGnRH en anguila, cfGnRH en pez gato, mdGnRH en medaka y pejerrey o sbGnRH en perciformes, pleuronectiformes y tetraodontiformes), aunque en otros casos es desempeñada por la forma GnRH 3 (sGnRH) como en osteglosiformes, cipriniformes y salmoniformes (Okuzawa *et al.*, 1990; Amano *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 1988; Rodríguez *et al.*, 2000; Okubo y Aida, 2001). No obstante, en perciformes la forma GnRH-3 (sGnRH) también alcanza la hipófisis en especies como la dorada (Powell *et al.*, 1994), tilapia (Weber *et al.*, 1997), lubina americana (Holland *et al.*, 2001) y lubina europea (González-Martínez *et al.*, 2002a), si bien sus funciones no están esclarecidas (Figura 13). Aunque la mayoría de los estudios han abordado los efectos de la GnRH sobre la liberación de LH, estudios recientes llevados a cabo en salmónidos han puesto de manifiesto que la GnRH es también capaz de estimular la secreción de FSH (Dickey y Swanson, 2000; Ando *et al.*, 2004). Además, los estudios llevados a cabo en diversas especies de peces demuestran que la GnRH también estimula la síntesis de las subunidades α y β de la LH y/o FSH, efectos que parecen estar relacionados con el estado de madurez sexual de los individuos (Khakoo *et al.*, 1994; Dickey y Swanson, 2000; Mateos *et al.*, 2002; Yaron *et al.*, 2003).

Asimismo, en ciprínidos se han descrito efectos estimuladores de la GnRH sobre la secreción de hormona de crecimiento y/o la expre-



sión de sus ARN mensajeros, si bien estas acciones parecen depender de la especie ya que en salmónidos son menos evidentes, y en peces gato y anguilas no se han podido determinar (Trudeau, 1997; Weil *et al.*, 1999; Rousseau *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2002). Estos efectos están mediados por receptores de GnRH ya que pueden ser bloqueados por antagonistas de la GnRH (Murthy y Peter, 1994). Además, la GnRH estimula la secreción de prolactina y somatolactina en *Oreochromis mossambicus* (Weber *et al.*, 1997) y en la trucha arcoiris (Kakizawa *et al.*, 1997), respectivamente, así como la expresión de los ARNm de prolactina (Bhandari *et al.*, 2003) y/o somatolactina (Taniyama *et al.*, 2000; Bhandari *et al.*, 2003) en salmónidos. Los efectos estimuladores de la GnRH en la liberación y/o expresión de GH, prolactina y somatolactina son consistentes con la presencia de fibras GnRH en el entorno de las células somatotropas, lactotropas y somatolactotropas (Figura 14) (Parhar e Iwata, 1994; Mousa y Mousa, 2003) y la presencia de receptores de GnRH y/o sitios de unión a GnRH en estas células (Cook *et al.*, 1991; Stefano *et al.*, 1999; Parhar *et al.*, 2005).

Otros decapeptidos de la familia GnRH (sGnRH o GnRH-3 y cGnRH-II o GnRH-2) también parecen involucrados en el control de las conductas reproductivas en hembras de carpín dorado (Volkoff y Peter, 1999). En machos de un pez territorial como el cíclido africano *Haplochromis*

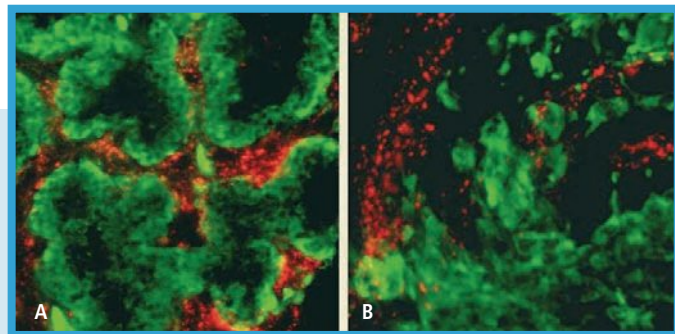


FIGURA 14.

Identificación inmunohistoquímica de fibras de la isoforma sbGnRH (en rojo) en el entorno de las células somatotropas (en verde, A) y de prolactina (en verde, B) en la hipófisis de la lubina (F. Confente).



burtoni, los cambios en el estatus social se asocian a cambios en la expresión del gen GnRH 1 y en el tamaño de las neuronas del área preóptica (White *et al.*, 2002). Se ha sugerido que las acciones de la GnRH sobre las conductas reproductivas podrían estar mediadas por su interacción con los sistemas neurosecretores de vasotocina e isotocina presentes en el área preóptica (Foran and Bass, 1999; Saito *et al.*, 2003). Asimismo, se han sugerido acciones neuromoduladoras de las formas sGnRH y cGnRH-II sobre sistemas sensoriales y sensorimotors (Umino y Dowling, 1991; Behrens *et al.*, 1993; Fernald y White, 1999).

1.3.2.1.3. Los receptores de GnRH

Las acciones hipofisiotróficas de la hormona liberadora de gonadotrofinas están mediadas por su unión a receptores específicos presentes en la membrana de las células gonadotropas adenohipofisarias (Conn y Crowley, 1994). Estos receptores de GnRH pertenecen a una superfamilia de receptores acoplados a la proteína G y poseen una sola cadena polipeptídica con siete dominios transmembrana hidrofóbicos separados por giros hidrófilos extra e intra-celulares de extensión variable (Sealfon *et al.*, 1997). En mamíferos, la estructura del receptor de GnRH es característica debido a la ausencia del dominio intracelular presente en los receptores de los demás vertebrados (Sealfon *et al.*, 1997). La interacción de la GnRH con su receptor desencadena una cascada de reacciones intracelulares que se inicia con la activación de la proteína G, y conduce a la producción de segundos mensajeros del tipo del diacilglicerol o el inositol trifosfato, que a su vez estimulan la liberación de iones calcio de sus reservorios intracelulares (Klausen *et al.*, 2002). Además, se han descrito acciones de la GnRH mediadas por otras vías de señalización intracelular que inducen la producción de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y ácido araquidónico (Bogerd *et al.*, 2002; Pati and Habibi, 2002).

En peces, los primeros receptores de GnRH fueron detectados en la hipófisis, si bien hoy resulta evidente que también se expresan en tejidos extrahipofisarios como el cerebro, las gónadas, el hígado o el riñón, reforzando la idea de que estos decapeptidos no sólo ejercen acciones reproductivas a nivel de la hipófisis, sino que pueden actuar como neurotransmisores y/o neuromoduladores en el cerebro, y como factores



autocrinos o paracrinos en las gónadas (Marshall *et al.*, 1976; Habibi y Pati, 1993, Yu *et al.*, 1998). La presencia de receptores de GnRH en tejidos somáticos que no están involucrados directamente en la reproducción sugiere un papel importante de estos receptores de GnRH en la mediación de las acciones autocrinas/paracrinas de la GnRH sobre otros procesos fisiológicos, que aún deben ser esclarecidas.

El número de receptores de GnRH hipofisarios varía a lo largo del ciclo reproductivo de peces (Habibi y Peter, 1991; González-Martínez *et al.*, 2004b). Asimismo, la capacidad y/o expresión de los receptores de GnRH puede verse alterada por el entorno endocrino, y en concreto por la gonadectomía (Marian *et al.*, 1981), el tratamiento con GnRH (Kaiser *et al.*, 1993), dopamina (De Leeuw *et al.*, 1989) y esteroides gonadales (Trudeau *et al.*, 1993; Seong *et al.*, 1998).

El primer receptor de GnRH fue clonado a partir de células hipofisarias de ratón (Tsutsumi *et al.*, 1992) y posteriormente en humanos (Kakar *et al.*, 1992) al inicio de los años noventa. En los últimos años, también se han clonado y caracterizado los cDNAs de distintos receptores de GnRH presentes en peces de los ordenes anguiliformes, cipriniformes, salmoniformes, beloniformes, perciformes y tetraodontiformes (ver revisiones de Lethimonier *et al.*, 2004 y Kah *et al.*, 2007). Estos estudios han puesto de manifiesto que al igual que se expresan dos o tres formas distintas de GnRH en vertebrados, también se pueden expresar dos o más tipos distintos de receptores de GnRH (Troskie *et al.*, 1998; Kah *et al.*, 2007). Así, tanto en la rana toro (Wang *et al.*, 2001) como en medaka (Okubo *et al.*, 2003) se describieron tres receptores de GnRH. Las búsquedas en las bases de datos del genoma de *Fugu* y *Tetraodon* permitieron identificar la presencia de 5 secuencias codificantes para 5 receptores de GnRH diferentes que fueron denominados GnRH-R1 a GnRH-R5 (Lethimonier *et al.*, 2004). Posteriormente, han sido clonados y caracterizados 5 receptores de GnRH en la lubina (González-Martínez *et al.*, 2004b; Lethimonier *et al.*, 2004, Moncaut *et al.*, 2005). De estos 5 receptores, 3 de ellos se consideraron en principio de tipo I y 2 se consideraron de tipo II (Lethimonier *et al.*, 2004). Estudios recientes han evidenciado que el receptor de GnRH de tipo I descrito en mamíferos, que carece de una cola intracelular, tiene más afinidad por la forma GnRH-1 que por la forma GnRH-2, y produce más inositol trifosfato en respuesta a la GnRH-1 que

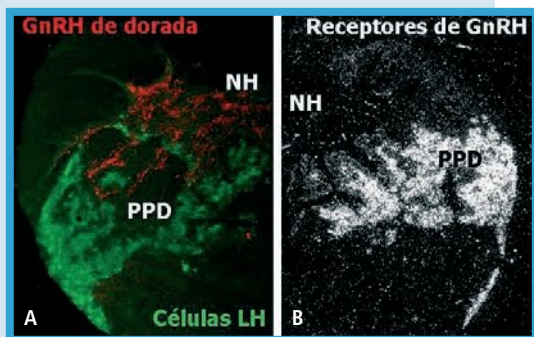


a la GnRH-2, es el único que parece representar un verdadero receptor de tipo 1 (Millar *et al.*, 2001; Kah *et al.*, 2007). Los demás receptores caracterizados en mamíferos, aves, anfibios y peces poseen una cola intracelular adicional y tienen una mayor afinidad por la forma GnRH-2, que es más potente que la forma GnRH-1 o GnRH-3 en la estimulación de la producción de inositol trifosfato, por lo que debieran ser considerados de tipo II (Kah *et al.*, 2007). Por ello, se ha propuesto una nueva nomenclatura para los 5 receptores de GnRH descritos en peces que los agrupa en receptores de tipo II-1a, II-1b, II-1c, II-2a y II-2b (Kah *et al.*, 2007).

Todas estas evidencias sugieren que ha existido una evolución más o menos paralela de las GnRHs y de sus receptores, ligada a duplicaciones génicas y a pérdidas selectivas de genes y que, posiblemente, existe a lo largo de la evolución una especialización funcional y topográfica en el establecimiento de sus interacciones. Por ello, resulta crucial determinar no sólo dónde se expresa cada forma de GnRH y hacia donde envía sus proyecciones sino qué tipo de receptor se expresa en esa región terminal, porque eso nos dará una idea clara sobre qué forma de receptor está actuando esa forma de GnRH concreta. A modo de ejemplo, en la lubina, los 5 receptores caracterizados tienen más afinidad por la forma GnRH-2, si bien el receptor de tipo GnRHRII-1a muestra también cierta afinidad por las formas GnRH-1 y GnRH-3 (Kah *et al.*, 2007). Este receptor se expresa en las células FSH y LH de la hipófisis de la lubina, que recibe una inervación de las formas GnRH-1 y GnRH-3 (Figura 15) y, aunque el receptor tiene más afinidad por la forma GnRH-2, ésta no alcanza la hipófisis con lo cual no puede interactuar con él (González-Martínez *et al.*, 2002a; González-Martínez *et al.*, 2004b). Este receptor de tipo GnRHRII-1a muestra diferencias significativas en su expresión durante el ciclo reproductivo (González-Martínez *et al.*, 2004b), lo que sugiere un papel relevante de este receptor en el control de la secreción de gonadotrofinas y del ciclo reproductivo. Sin embargo, otros tipos de receptores de GnRH presentan una elevada expresión en cerebro y una baja expresión en la hipófisis de la lubina (Moncaut *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que la forma GnRH-2 se distribuye de forma profusa en el cerebro de la lubina, estos receptores podría estar mediando las acciones neurotransmisoras y/o neuromoduladoras de esta forma de GnRH a nivel cerebral (Lethimonier *et al.*, 2004; Kah *et al.*, 2007).

FIGURA 15.

A. Identificación inmunohistoquímica de fibras de la isoforma sbGnRH (en rojo) en el entorno de las células LH (en verde) en la pars distalis proximal (PPD) de la hipófisis de la lubina. B. Detalle de la misma región de la hipófisis en la que se evidencia la presencia de receptores de GnRH mediante hibridación *in situ*. NH, neurohipófisis. Modificado de González-Martínez *et al.*, 2004b.



1.3.2.2. Dopamina

Si la GnRH constituye el principal factor cerebral estimulador de la secreción de gonadotrofinas y de la reproducción en peces, su antagonista funcional esta representado por la dopamina, que inhibe la secreción de estas hormonas adenohipofisarias y bloquea el proceso reproductivo. Los estudios pioneros que permitieron vislumbrar la existencia de un factor cerebral inhibidor de la síntesis de gonadotrofinas y de la reproducción en peces se debieron a Richard E. Peter trabajando con el carpín dorado (Peter y Paulencu, 1980). En estos estudios, se provocaron lesiones electrolíticas en el área preóptica y el hipotálamo en hembras de carpín dorado, que tuvieron como consecuencia una elevación en los niveles de gonadotrofinas y la ovulación en animales mantenidos a 12°C, una temperatura a la cual estos animales no ovulan en condiciones normales (Figura 16). Estas experiencias sugerían que el área preoptica y/o el hipotálamo secretaban un producto de naturaleza inhibidora, que se denominó en primera estancia GRIF, las siglas de «*Gonadotrophin-Releasing Inhibitory Factor*», y que era eliminado o no alcanzaba la hipófisis cuando se destruían estas estructuras cerebrales.

El uso de técnicas de perfusión con células dispersas y fragmentos de hipófisis de carpines dorados permitió determinar el efecto que distintas sustancias químicas ejercían sobre la actividad secretora de las células adenohipofisarias. De esta forma, Chang y colaboradores



demonstraron que la dopamina era la principal responsable de estos efectos inhibidores sobre la secreción de gonadotrofinas (Chang and Peter, 1983; Chang *et al.*, 1983). En consonancia con estas evidencias, el área preóptica antero-ventral presentaba células catecolaminérgicas que establecen contacto directo con las células gonadotropas (Kah *et al.*, 1987, Kah *et al.*, 1993), lo que explica por qué la destrucción de esta región cerebral abolía la inhibición de la secreción de gonadotrofinas. Chang y colaboradores también identificaron los tipos de receptores que mediaban esta inhibición dopaminérgica sobre la secreción de gonadotrofinas basal e inducida por GnRH, mediante el uso de diversos agonistas y antagonistas específicos para cada tipo de receptor (Chang *et al.*, 1990). Estos estudios demostraron que las acciones inhibitorias de la dopamina se ejercían sobre receptores de tipo D2 presentes en las células gonadotropas (Figuras 16, 17) (Chang *et al.*, 1990). Estas acciones de la dopamina parecen afectar a la producción de segundos mensajeros que median en las cascadas de transducción intracelular, reduciendo la entrada de calcio en las células e inhibiendo la activación de la proteína kinasa C inducida por el diacilglicerol (Chang *et al.*, 1996). La dopamina también inhibe la liberación de

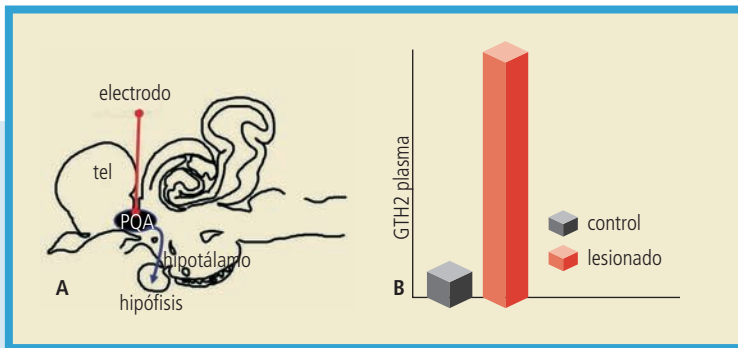


FIGURA 16.

A. Esquema que muestra la estrategia utilizada en los experimentos de lesión del área preóptica (POA) para evidenciar la presencia de un factor inhibidor de la liberación de gonadotrofinas. B. En los individuos lesionados la secreción de gonadotrofinas era significativamente mayor que en los animales intactos. Modificado de Peter y Paulencu, 1980; Kah *et al.*, 1987.



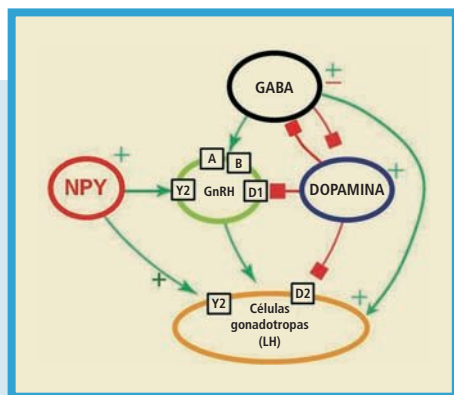
GnRH actuando sobre receptores de tipo D2 presentes en terminales nerviosos de la hipófisis, así como la síntesis y la liberación de GnRH en el telencéfalo y la región preóptica actuando sobre receptores de tipo D1 (Figura 17) (Peter *et al.*, 1991, Trudeau, 1997). Estas acciones son consistentes con la presencia de contactos sinápticos axo-somáticos y axo-dendríticos de fibras dopaminérgicas sobre las neuronas GnRH del telencéfalo ventral y del área preóptica (Anglade *et al.*, 1991).

La existencia de una inhibición dopaminérgica de la secreción de gonadotrofinas ha sido demostrada en otras especies de peces teleósteos, tales como la anguila, el pez gato, la trucha, la tilapia, el salmon coho, la carpa o el mujol (Van Asselt *et al.*, 1988; Levavi-Sivan *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2004; Dufour *et al.*, 2005; Aizen *et al.*, 2005). Sin embargo, esta inhibición no parece clara en otros peces teleósteos, en particular en perciformes marinos como la lubina americana o europea (Holland *et al.*, 1998b; Prat *et al.*, 2001).

Estas acciones inhibitorias de la dopamina se han puesto de manifiesto, sobre todo, sobre las células secretoras de LH (Trudeau, 1997; Yaron *et al.*, 2003). No obstante, en especies como la trucha también se han descrito efectos de la dopamina sobre los niveles de FSH (Vacher *et al.*, 2000). Las acciones de la dopamina están moduladas por los esteroides sexuales y, en particular, por el estradiol. Así, la inhibición dopaminérgica se correlaciona de forma positiva con los niveles circulantes de estradiol durante el periodo preovulatorio en truchas hembra (Linard *et al.*, 1995). En la trucha se ha descrito que el estradiol

FIGURA 17.

Esquema que muestra la naturaleza de las acciones directas e indirectas de la dopamina, el neuropéptido Y, y el GABA sobre la liberación de gonadotrofinas. Las flechas verdes representan acciones estimuladoras (+) y las líneas rojas rematadas en cuadrados rojos representan acciones inhibitorias. Modificado de Trudeau 1997.





estimula la síntesis de la tirosina hidroxilasa, la enzima clave para la síntesis de dopamina (Vetillard *et al.*, 2003) y las neuronas tirosina hidroxilasa-positivas del área preóptica presentan receptores de estradiol (Linard *et al.*, 1996). En el mismo sentido, la elevación en los niveles de estradiol determina un incremento en la expresión *in vivo* e *in vitro* del receptor de dopamina de tipo D2 y está asociada con una inhibición en la liberación tanto de LH como de FSH en la tilapia (Levavi-Sivan *et al.*, 2006). Además, el gen del receptor de dopamina de tipo D2 de *Mugil cephalus* presenta elementos de respuesta a estrógenos en su promotor (Nocillado *et al.*, 2007). Todos estos resultados sugieren que los efectos del estradiol sobre los receptores dopaminérgicos de tipo D2 y sobre la inhibición dopaminérgica de la secreción de gonadotrofinas forman parte de los mecanismos de retroalimentación negativa de los esteroides durante los estadios de vitelogénesis (Levavi-Sivan *et al.*, 2006). Recientemente, se ha descrito en la anguila una retroalimentación positiva de los andrógenos sobre neuronas dopaminérgicas del área preóptica, que proyectan a la hipófisis e inhiben la secreción de gonadotrofinas en otros teleósteos, así como una estimulación androgénica de la actividad dopaminérgica en el bulbo olfativo (Weltzien *et al.*, 2006). Estas evidencias han proporcionado una importante base neuroanatómica y funcional para entender las acciones de los esteroides gonadales sobre los sistemas dopaminérgicos centrales (Weltzien *et al.*, 2006).

1.3.3. Otros sistemas neuroendocrinos implicados en el control de la reproducción: Neuropeptido Y, GABA y otras neurohormonas

El neuropéptido tirosina o NPY fue aislado por primera vez a partir del cerebro de cerdos (Tatemoto, 1982). Este péptido pertenece a la familia del polipéptido pancreático y está implicado en el control de la ingesta y el metabolismo, tanto en peces como en mamíferos.

Las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* han permitido identificar la distribución de las neuronas secretoras de NPY en el cerebro de peces teleósteos. Estas células se localizan en las placodas olfativas, el bulbo olfativo, la porción central del telencéfalo dorsal, el telencéfalo ventral, el área preóptica caudal, el tálamo, el techo óptico,



el núcleo entopeduncular y el locus cerúleo, siendo estos dos últimos núcleos los que parecen enviar las fibras NPY que alcanzan la hipófisis para establecer contacto con las células gonadotropas (Pontet *et al.*, 1989; Breton *et al.*, 1991; Kah *et al.*, 1993, Cerdá-Reverter *et al.*, 2000, Rodríguez-Gómez *et al.*, 2001; Gaikwad *et al.*, 2005).

El NPY posee efectos estimuladores sobre la secreción de gonadotropinas en peces, efectos que pueden ejercerse de forma directa sobre las células gonadotropas hipofisarias (Kah *et al.*, 1989; Peng *et al.*, 1993; Danger *et al.*, 1991; Trudeau, 1997) pero también estimulando la liberación de GnRH en el área preóptica/hipotálamo y en la hipófisis (Figura 17, 18a) (Peter *et al.*, 1991; Breton *et al.*, 1991, Trudeau, 1997; Gaikwad *et al.*, 2005). Así, en *Clarias batrachus* se ha descrito un solapamiento en la expresión de NPY y GnRH en células del sistema olfativo, así como en fibras nerviosas del telencéfalo ventral y en fibras y células de la hipófisis (Gaikwad *et al.*, 2005). El tratamiento intracerebroventricular con NPY en esta especie indujo un aumento significativo en los contenidos de GnRH-3 (sGnRH) en los órganos y bulbos olfativos, el telencéfalo, el área preóptica y la hipófisis (Gaikwad *et al.*, 2005). En la lubina, el efecto del NPY sobre la liberación de LH depende del estado energético de los animales, siendo mucho mayor en el

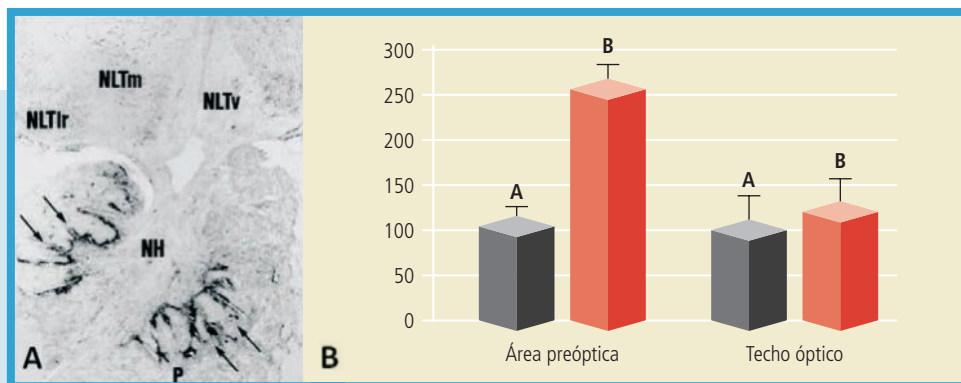


FIGURA 18.

A. Fibras NPY-inmunorreactivas en la hipófisis del lenguado. Tomado de Rodríguez-Gómez *et al.*, 2001. B. Efecto del ayuno sobre la expresión del NPY en el área preóptica y el techo óptico del salmón. Modificado de Silverstein *et al.*, 1998.



estado de ayuno, característico de la fase reproductiva (Cerdá-Reverter *et al.*, 1999). En este sentido, durante el ayuno también aumenta en el salmón la expresión del NPY en el área preóptica, un área de marcado carácter hipofisiotrófico (Figura 18b) (Silverstein *et al.*, 1998). La respuesta de la hipófisis al NPY puede ser bloqueada por la dopamina y presenta un carácter estacional, que parece depender de los niveles de esteroides (Peter *et al.*, 1991; Breton *et al.*, 1991; Peng *et al.*, 1993). Así se ha evidenciado que el estradiol y la testosterona estimulan la expresión génica del NPY, sobre todo a nivel del área preóptica (Peng *et al.*, 1994). Además, se ha descrito que el NPY estimula también en peces la secreción de hormona de crecimiento (Peng *et al.*, 1993, Trudeau, 1997). Esta diversidad de efectos confiere al NPY un papel relevante en la mediación de las interacciones entre reproducción, metabolismo y crecimiento en peces.

En cuanto a los aminoácidos neurotransmisores, el ácido γ -amino butírico (GABA) representa el principal neurotransmisor inhibitor en el cerebro de vertebrados. En el carpín dorado, el GABA está presente a elevadas concentraciones en el sistema hipotálamo-hipofisario, existiendo fibras GABAérgicas procedentes de la región preóptica y/o del *núcleo lateralis tuberis* hipotalámico en contacto directo con las células gonadotropas (Martinoli *et al.*, 1990; Kah *et al.*, 1992). La inyección con GABA provoca un aumento en la liberación de LH en el carpín dorado, acción que podría ejercerse directamente sobre las células gonadotropas (Figura 17), ya que en éstas se observa también un aumento en los niveles intracelulares de iones calcio (Kah *et al.*, 1992, Trudeau, 1997). El GABA también estimula la liberación de GnRH en los terminales nerviosos de la hipófisis (Kah *et al.*, 1992, Trudeau, 1997) e inhibe la actividad de las células dopaminérgicas (Figura 17) (Trudeau, 1997). Además, los inhibidores de la GABA-transaminasa producen una acumulación de GABA en el cerebro y la hipófisis, y un aumento en los niveles plasmáticos de gonadotrofinas. Estos efectos estimuladores del GABA son estacionales y están modulados por el estradiol (Kah *et al.*, 1992). A su vez, el tratamiento con estradiol provoca un descenso en la concentración de GABA en el telencéfalo del carpín dorado (Kah *et al.*, 1992). Los efectos del estradiol sobre las células GABAérgicas parecen ser directos ya que, al menos en la trucha, las



células GABA del área preóptica expresan receptores de estrógenos (O. Kah, comunicación personal). En la trucha, el GABA ejerce acciones estimuladoras tanto en la secreción de LH como de FSH, y como sucede en el carpín dorado, estos efectos dependen del estado reproductivo de los animales, pero también del sexo (Mañanos *et al.*, 1999). Estas acciones del GABA pueden ejercerse de forma directa sobre las células gonadotropas ya que el GABA estimula tanto la secreción basal de FSH y LH como la secreción inducida por GnRH en cultivos de células hipofisarias dispersas (Mañanos *et al.*, 1999).

La taurina es otro aminoácido neurotransmisor que está presente a elevadas concentraciones en el cerebro y la hipófisis del carpín dorado; provoca un rápido aumento en los niveles de gonadotrofinas del suero y parece actuar modulando los efectos inhibidores de la dopamina en la liberación de gonadotrofinas (Peter *et al.*, 1991, Trudeau, 1997). El ácido glutámico está presente en fibras y células de la hipófisis, incluidas las células gonadotropas (Kah *et al.*, 1993). El glutamato monosódico produce un aumento en los niveles séricos de LH y potencia la liberación de LH en respuesta a GnRH, probablemente actuando a través de receptores de NMDA (Kah *et al.*, 1993, Trudeau, 1997). Otro aminoácido neurotransmisor, la β -alanina, tiene también efectos estimuladores sobre la secreción *in vivo* de LH (Sloley *et al.*, 1992), si bien su presencia en el cerebro o la hipófisis no se ha descrito aún en peces.

Los péptidos opioides endógenos también han sido implicados en la regulación del eje cerebro-hipófisis-gónada en numerosas especies de mamíferos (Cicero *et al.*, 1985; Gilbeau *et al.*, 1987, Trudeau, 1997). Los agonistas de péptidos opioides inhiben la liberación de dopamina, mientras que sus antagonistas la estimulan (Leadem *et al.*, 1985). Se ha demostrado la existencia de diversos péptidos opioides en el cerebro de teleósteos y la presencia de receptores específicos para estos (Kawauchi *et al.*, 1980; Pert *et al.*, 1974; Rosemblum y Callard, 1988). Asimismo, se ha demostrado la modulación por péptidos opioides de la secreción de dopamina y de la respuesta de la hipófisis a GnRH y a dopamina en el carpín dorado (Rosemblum y Peter, 1989).

En el carpín dorado, la colecistoquinina (CCK) en forma sulfatada tiene efectos estimuladores sobre la liberación *in vitro* de LH en frag-



mentos de hipófisis (Himick *et al.*, 1993), si bien estos efectos resultan más evidentes en animales maduros que en animales en regresión.

La noradrenalina (NA) estimula, a través de receptores α -1 adrenérgicos, la liberación de gonadotrofinas en la hipófisis (Chang *et al.*, 1991, Trudeau, 1997), así como de GnRH en el área preóptica y en el hipotálamo (Yu y Peter, 1992, Trudeau, 1997). Aunque no existen referencias claras de la existencia de fibras noradrenérgicas en la hipófisis de teleósteos, esta inervación podría provenir del *locus coeruleus* (Kah *et al.*, 1993).

La serotonina (5-hidroxitriptamina ó 5-HT) estimula la liberación de gonadotrofinas en el carpín dorado y en el salmón atlántico a través de una acción directa en la hipófisis mediada por receptores 5-HT₂ (Somoza y Peter, 1991; Khan y Thomas, 1991, Trudeau, 1997). También estimula la liberación de GnRH en el área preóptica, hipotálamo anterior e hipófisis (Yu *et al.*, 1991). En la hipófisis existen células 5-HT inmunoreactivas pero no parecen existir fibras 5-HT positivas (Kah *et al.*, 1993), lo que induce a pensar que la serotonina de la hipófisis no procede de terminales nerviosos sino que es sintetizada por células de la hipófisis o captada por éstas a partir de la sangre. La serotonina es también un precursor para la síntesis de la melatonina pineal, de la que ya se ha hablado con anterioridad al principio del presente capítulo.

La leptina es un péptido secretado por los adipocitos que fue identificado en 1994 en mamíferos, y que desempeña un importante papel en la regulación del peso corporal y el metabolismo (Zhang *et al.*, 1994; Halaas *et al.*, 1995). Recientemente, se ha sugerido que este péptido podría ejercer funciones en el eje reproductivo desempeñando, al igual que el NPY, acciones mediadoras en la regulación del balance energético y la reproducción a través de sus acciones en el eje hipotálamo-hipofisario (Yu *et al.*, 1997; Magni *et al.*, 2000). En peces, existen también evidencias de que la leptina está implicada en el control neuroendocrino de la función adenohipofisaria. Así, la leptina estimula en la lubina la secreción de LH a través de una acción directa sobre la hipófisis (Peyon *et al.*, 2001). Esta respuesta varía en función del estado de desarrollo sexual de los animales y es independiente de la estimulación de la secreción de LH inducida por GnRH. Además, la leptina actúa de forma sinérgica con el NPY estimulando la secreción



de LH en lubinas prepúberes pero no en lubinas postpuberales. Estos resultados han llevado a postular un efecto de la leptina en el inicio de la pubertad en peces, así como en el proceso reproductivo en individuos adultos (Peyón *et al.*, 2001).

1.3.4. ¿QUE HAY DE NUEVO EN EL ESTUDIO DEL CEREBRO NEUROENDOCRINO?

1.3.4.1. Kisspeptinas

El esquema clásico de control neuroendocrino de la reproducción que ha estado vigente durante las últimas décadas, y que implica a los sistemas neurohormonales GnRH como inductores de la secreción de gonadotrofinas (FSH y LH) en células hipofisarias, las cuales actúan, a su vez, sobre las gónadas para inducir los procesos de gametogénesis y esteroidogénesis gonadal, se ha visto revolucionado recientemente por el descubrimiento de las kisspeptinas, codificadas por el gen *KISS-1*, y que actúan sobre un receptor de membrana acoplado a la proteína G denominado GPR54 (Roa y Tena-Sempere, 2007). En un principio, el péptido principal codificado por el gen *KISS-1* fue denominado metastatina por su capacidad para inhibir la metástasis tumoral (Ohtaki *et al.*, 2001). Sin embargo, estudios posteriores llevados a cabo en humanos y en ratones demostraron el papel relevante de las kisspeptinas y su receptor en el eje reproductivo (Roa y Tena-Sempere, 2007).

Los estudios de mutagénesis y «knock-out» del gen que codifica para el receptor de *KISS-1*, GPR54, han mostrado su implicación en la regulación de la pubertad. Así, los pacientes con mutaciones que determinaban una pérdida de funcionalidad del GPR54 presentaban hipogonadismo hipogonadotrófico. Por otro lado, los ratones que carecían del GPR54 eran incapaces de iniciar la pubertad, presentaban órganos reproductivos inmaduros y niveles reducidos de esteroides gonadales y gonadotrofinas hipofisarias. Además, se ha descrito la presencia del ARNm de *KISS-1* en células del hipotálamo (núcleo arcuato y núcleo anteroventral periventricular), la expresión de los receptores GPR54 en las células GnRH, y una activación de la expresión de FSH y LH dependiente de GnRH tras la inyección periférica o intracerebroventricular de kisspeptina, así como una elevación considerable de los niveles de los



ARNm de KiSS-1 y GPR54 al inicio de la pubertad (Roa y Tena-Sempere, 2007). En conjunto, todos estos resultados sugieren que las kisspeptinas y su receptor GPR54 están implicados en la activación peripuberal de las neuronas GnRH y en la liberación de GnRH hipotalámica, y representan factores críticos en la inducción de la cascada reproductiva que conduce a la pubertad (Kuohung y Kaiser, 2006; Messenger *et al.*, 2005; Tena-Sempere, 2006).

Además, las kisspeptinas se han relacionado con el ciclo reproductivo en adultos y con la secreción de gonadotrofinas durante el ciclo ovárico, la gestación y la lactancia (Roa y Tena-Sempere, 2007). La expresión de KiSS-1 (ARNm y péptido) y su receptor en el ovario y las experiencias que demuestran que la expresión hipotalámica de KiSS-1 está controlada por las hormonas esteroides gonadales sugieren un importante papel de las neuronas KiSS-1 en la retroalimentación positiva y negativa del estradiol sobre la secreción de gonadotrofinas, y refuerzan el creciente papel de estos péptidos y su receptor en el control neuroendocrino de la reproducción.

Hasta la fecha, las secuencias de cDNA del gen KiSS-1 sólo habían sido clonadas en mamíferos (Roa y Tena-Sempere, 2007) aunque recientemente se han identificado también en el pez cebra, lamprea marina, medaka, fugu y tetraodon (van Aerle *et al.*, 2008). Asimismo, se han identificado las secuencias de su receptor GPR54 en mamíferos, anfibios y algunas especies de peces como *Danio rerio*, *Oreochromis niloticus*, *Mugil cephalus*, *Rachycentron canadum*, *Micropogonias undulatus*, *Solea senegalensis* o *Pimephales promelas* (Parhar *et al.*, 2004; Nocillado *et al.*, 2007; Mohamed *et al.*, 2007; Roa y Tena-Sempere, 2007; Filby *et al.*, 2008; Mechaly *et al.*, 2007; GenBank Accession number: DQ347412). En tilapia, se ha observado que el receptor GPR54 se expresa en las neuronas GnRH-1, GnRH-2 y GnRH-3 y que el número de neuronas GnRH que expresan GPR54 es mayor en machos maduros que en machos inmaduros (Parhar *et al.*, 2004). Estos autores han propuesto también que la expresión de GPR54 es una señal necesaria para detener la migración de las neuronas GnRH-1, GnRH-2, y GnRH-3 y para un normal desarrollo del eje reproductivo. En la cobia, las variaciones conjuntas en la expresión de los ARNm de GPR54 y las diferentes formas de GnRH durante el desarrollo larvario y juvenil y la pubertad también refuerzan



la importancia de GPR54 en el control de la maduración de los sistemas GnRH y en su secreción durante estos procesos (Mohamed *et al.*, 2007). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en *Pimephales promelas* que muestran una variación conjunta en la expresión cerebral de GPR54 y la forma GnRH3 en estadios tempranos de la pubertad, y una estimulación de la expresión de ambos genes por la kisspeptina-10 (Figura 19) (Filby *et al.*, 2008). En *Mugil cephalus*, los estadios de pubertad temprana se caracterizan también por una mayor expresión cerebral de GPR54 en relación con los estadios intermedios y avanzados, y la expresión de GPR54 también experimenta cambios en la gónada durante el proceso de pubertad (Nocillado *et al.*, 2007). Por tanto, estos estudios representan una novedosa línea de acción de considerable interés para el esclarecimiento de los mecanismos neuroendocrinos que regulan la pubertad y la reproducción en peces.

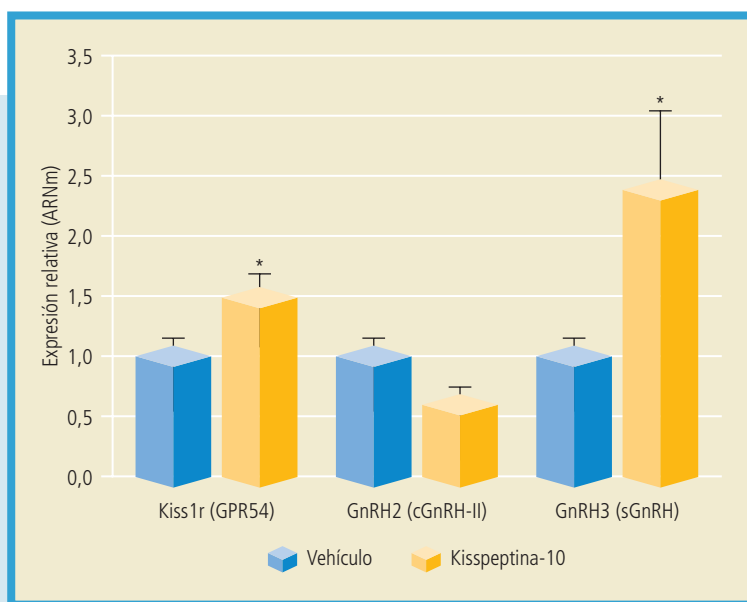


FIGURA 19.

Expresión de Kiss1r, GnRH-2 y GnRH-3 determinada mediante RT-PCR en el cerebro de ejemplares en pubertad temprana-media de *Pimephales promelas* tratados con kisspeptina-10 (2 nmol/g peso) o vehículo. Modificado de Filby *et al.*, 2008.



1.3.4.2. Hormona inhibidora de las gonadotrofinas (GnIH)

En el año 2000 se identificó en aves un pequeño péptido hipotalámico de 12 aminoácidos que actuaba directamente sobre la hipófisis inhibiendo la síntesis y liberación de gonadotrofinas (Tsutsui *et al.*, 2000; Tsutsui *et al.*, 2007), por lo que fue denominado hormona inhibidora de las gonadotrofinas o GnIH (Figura 20). La GnIH pertenece a la familia de péptidos RFamida, que está presente tanto en invertebrados como en vertebrados (Price y Greenberg, 1977; Rastogi *et al.*, 2000; Tsutsui y Ukena, 2006; Kriegsfeld, 2006; Tsutsui *et al.*, 2007). Este neuropéptido se sintetiza en forma de un precursor que, según el grupo filogenético, contiene las secuencias de dos (mamíferos), tres (aves) o cuatro (anfibios) péptidos de la familia RFamida que presentan el dominio LPXRF-amida (X = L o Q) en su extremo carboxilo terminal (Tsutsui y Ukena, 2006).

La identificación y localización cerebral de estos neuropéptidos GnIH se ha llevado a cabo mediante técnicas de ELISA, técnicas inmu-

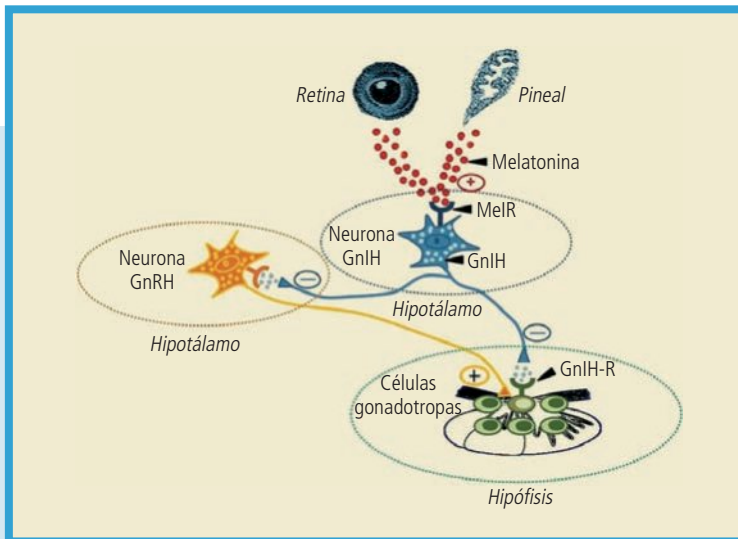


FIGURA 20.

Esquema de las acciones propuestas de la GnIH sobre la síntesis y liberación de gonadotrofinas hipofisarias y de GnRH hipotálamica y su regulación por melatonina. Modificado de Tsutsui *et al.*, 2007.



nohistoquímicas y técnicas de hibridación *in situ* (Tsutsui *et al.*, 2000; Tsutsui y Ukena, 2006; Tsutsui *et al.*, 2007). Así, los niveles de GnIH en el diencéfalo de vertebrados son considerablemente superiores a los encontrados en otras áreas cerebrales. En aves, las células GnIH se localizan en el núcleo paraventricular hipotalámico y en el área septal lateral y medial del cerebro (Tsutsui y Ukena, 2006; Tsutsui *et al.*, 2007). En cambio, la distribución de fibras GnIH en el cerebro es mucho más profusa, siendo particularmente evidentes en la eminencia media hipotalámica, el telencéfalo (septum y paleoestriado ventral), el área preóptica, el techo óptico y la medula oblongata (Tsutsui y Ukena, 2006). En el área preóptica, las fibras GnIH aparecen en el entorno de las células GnRH-1 (cGnRH-I), así como en proximidad de las fibras GnRH-1 presentes en la eminencia media (Bentley *et al.*, 2003). La clonación reciente de un posible receptor para la GnIH en aves ha permitido caracterizar su expresión en la hipófisis, el hipotálamo y la médula espinal (Yin *et al.*, 2005). Además, se ha descrito la presencia de sitios de unión de la GnIH en las células GnRH-2 (cGnRH-2) y en las fibras GnRH-1 (cGnRH-1) de la eminencia media (Bentley *et al.*, 2006). Estas evidencias, así como las obtenidas en mamíferos (Kriegsfeld *et al.*, 2006), sugieren que la GnIH puede también modular la síntesis y liberación de GnRH en el hipotálamo y desempeñar acciones neuromoduladoras a nivel cerebral, además de ejercer efectos inhibidores directos sobre la secreción de gonadotrofinas hipofisaria (Figura 20). A su vez, la síntesis y secreción de GnIH hipotalámica en aves parece estar sometida a una estimulación por la melatonina (Figura 20) (Tsutsui *et al.*, 2007). Así, la expresión de la GnIH está controlada por el fotoperiodo y es mayor en animales sometidos a fotoperiodo corto, que presentan una exposición nocturna a melatonina más duradera, el tratamiento con melatonina en individuos pinealectomizados y sometidos a enucleación ocular determina una elevación en la expresión y en la secreción de GnIH y las células GnIH hipotalámicas presentan receptores de melatonina de tipo Mel1C (Tsutsui *et al.*, 2007). Por ello, estas células GnIH podrían desempeñar un papel relevante en la integración de la información ambiental y en la transducción de la información del fotoperiodo a otros centros neuroendocrinos. La GnIH también inhibe el desarrollo gonadal, la síntesis de esteroides y la actividad esperma-



togénica en aves, lo que sugiere que este neuropéptido puede actuar a distintos niveles del eje reproductivo (Tsutsui *et al.*, 2007).

La presencia de células GnIH en el hipotálamo posterior parece una característica conservada a lo largo de la evolución de vertebrados (Tsutsui *et al.*, 2007). Así, recientemente se ha puesto también de manifiesto la presencia de un péptido similar de tipo LPXRF-amida en peces (Sawada *et al.*, 2002; Osugi *et al.*, 2006; Tsutsui *et al.*, 2007). En el carpín dorado, estas células GnIH están presentes en el núcleo periventricular posterior del hipotálamo, si bien también se han detectado algunas células inmunorreactivas en la región del nervio terminal de los bulbos olfativos, una región que presenta células de la forma GnRH-3 (Sawada *et al.*, 2002; Kah *et al.*, 2007). Las fibras GnIH-inmunorreactivas están presentes principalmente en el núcleo lateral tuberal del hipotálamo y en la hipófisis del carpín, aunque también inervan otras regiones como el telencéfalo ventral y el techo óptico (Sawada *et al.*, 2002). Estos estudios en peces son muy preliminares, y queda por determinar si este péptido de la familia LPXRF-amida tiene en este grupo filogenético las mismas funciones descritas para el sistema GnIH en aves y en mamíferos, por lo que su estudio representa una línea de investigación de notable interés para el esclarecimiento del control neuroendocrino y ambiental de la reproducción en peces.

1.4. TRANSDUCCIÓN DE LA INFORMACIÓN DE LOS CENTROS FOTORRECEPTORES HACIA LOS CENTROS NEUROENDOCRINOS Y LA HIPÓFISIS

Una cuestión que permanece sin resolver es cómo la información del fotoperiodo alcanza a estos sistemas neuroendocrinos y/o hipofisiotróficos que controlan la actividad de la hipófisis y la secreción de gonadotrofinas. Los estudios de trazado neuronal, moleculares, inmunohistoquímicos y fisiológicos desarrollados en nuestro laboratorio utilizando la lubina como modelo nos han permitido identificar algunas de estas posibles conexiones. Así, el sinencéfalo dorsal, un área que contiene células de tipo GnRH-2 (cGnRH-II), recibe proyecciones directas desde



el órgano pineal. A su vez, el órgano pineal de la lubina recibe una inervación directa desde las células GnRH-2 y expresa receptores de GnRH (González-Martínez *et al.*, 2004b; Servili *et al.*, 2005, 2007), que parecen variar su expresión de manera estacional. Los estudios *in vivo* e *in vitro* llevados a cabo en nuestro laboratorio han permitido determinar que la GnRH-2 es capaz de estimular la secreción de melatonina nocturna en el órgano pineal de la lubina (Servili *et al.*, 2007). Las células GnRH-3 (sGnRH) del nervio terminal se encuentran también conectadas con la retina, que presenta fibras GnRH-3 y receptores de GnRH. Estas evidencias refuerzan la existencia de interacciones de los sistemas GnRH-2 y GnRH-3 con los principales centros fotorreceptores (pineal y retina, respectivamente) de la lubina (Figura 21). Estos resultados, junto con informaciones previas sobre la inervación de los distintos sistemas GnRH en la hipófisis de la lubina (González-Martínez *et al.*, 2002a), sugieren que las acciones de los sistemas GnRH-2 y GnRH-3 sobre el eje reproductivo pueden estar más centradas en la modulación de la actividad de los centros fotorreceptores que en el control directo de la actividad hipofisaria y de la secreción de gonadotrofinas.

A su vez, otras áreas cerebrales y sistemas neuroendocrinos son candidatos a mediar estas interacciones. El núcleo preóptico parvocelular

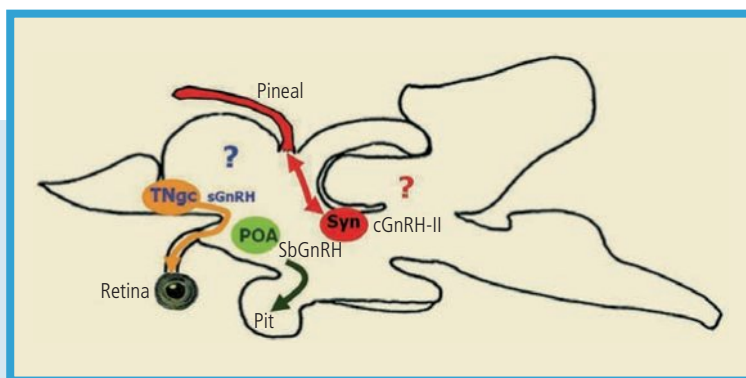


FIGURA 21.

Esquema de las interacciones propuestas entre los sistemas sGnRH y cGnRH-II con los centros fotorreceptores (retina y órgano pineal, respectivamente) en el cerebro de la lubina. La forma sbGnRH tiene funciones hipofisiotróficas.



presenta células GnRH-1 (González-Martínez *et al.*, 2001; 2002a), receptores de GnRH (González-Martínez *et al.*, 2004b), receptores de melatonina (Herrera-Pérez *et al.*, 2007), y contiene numerosas neuronas que proyectan a la hipófisis (García-Robledo y Muñoz-Cueto, datos no publicados) (Figura 22). El núcleo supraquiasmático de la lubina presenta proyecciones directas desde la retina (Servili y Muñoz-Cueto, en preparación), expresa receptores de melatonina (Herrera-Pérez *et al.*, 2007), posee células hipofisiotróficas (García-Robledo y Muñoz-Cueto, datos no publicados) y que expresan el neuropéptido Y (Cerdá-Reverter *et al.*, 2000), un neuropéptido que alcanza de forma directa la hipófisis de peces y presenta acciones estimuladoras de la secreción de gonadotrofinas (Kah *et al.*, 1989; Trudeau, 1997; Cerdá-Reverter *et al.*, 1999). El núcleo lateral tuberal ventral del hipotálamo es también un candidato a mediar en la transducción de la información del fotoperiodo a los sistemas neuroendocrinos ya que posee receptores de melatonina (Herrera-Pérez *et al.*, 2007) y de GnRH (González-Martínez *et al.*, 2004b), presenta células NPY-positivas (Cerdá-Reverter *et al.*, 2000) y células que proyectan a la hipófisis (datos no publicados). La presencia de estas células NPY en regiones hipofisiotróficas del área preóptica y del hipotálamo que reciben una información directa (neu-

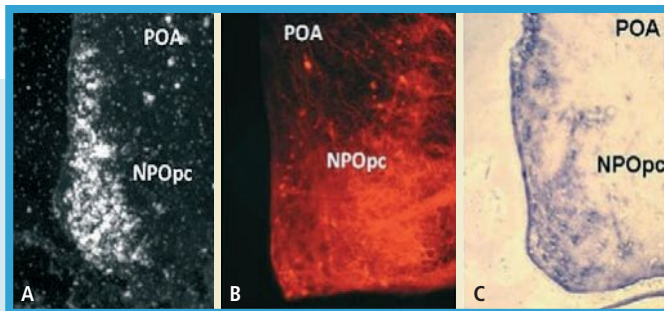


FIGURA 22.

El núcleo preóptico parvocelular es un candidato a mediar las interacciones de la información del fotoperiodo con el cerebro reproductivo ya que presenta receptores de GnRH (A), células hipofisiotróficas (B) y receptores de melatonina (C) (González-Martínez *et al.*, 2004b; Herrera-Pérez *et al.*, 2007).



ral o neuroendocrina) desde los centros fotorreceptores resulta de gran interés ya que este neuropéptido está implicado también en el control de la ingesta. Así, el NPY podría constituir un nexo de unión entre la reproducción y metabolismo ya que, como se indicó anteriormente, muchas especies de peces cesan su ingesta durante el periodo reproductivo, la expresión del NPY aumenta en el área preóptica durante el ayuno (Silverstein *et al.*, 1998) y en la lubina el efecto estimulador del NPY sobre la liberación de LH es también mayor en individuos en ayuno (Cerdá-Reverter *et al.*, 1999).

Por último, las células catecolaminérgicas del núcleo ventromedial del tálamo pueden estar implicadas en estas interacciones ya que en la lubina la hipófisis presenta fibras catecolaminérgicas y recibe proyecciones desde este núcleo, que está conectado de forma bidireccional con el órgano pineal (Servili *et al.*, 2005) y presenta receptores de melatonina (Herrera-Pérez *et al.*, 2007) y de GnRH (González-Martínez *et al.*, 2004b).

Además, mediante estudios de expresión de ARNm, estudios farmacológicos y de unión de radioligandos a membranas se ha puesto de manifiesto la presencia de receptores de melatonina en la hipófisis del lucio, la trucha y la lubina (Gaildrat y Falcón, 2000; Falcón *et al.*, 2003, Sauzet *et al.*, 2008), lo que indica que la hipófisis puede representar también una diana directa para las acciones de la melatonina.

La profundización en este tipo de estudios resulta necesaria ya que puede contribuir al esclarecimiento de los efectos que tienen las manipulaciones del fotoperiodo sobre la secreción de estos sistemas neuroendocrinos y aportar informaciones básicas de gran interés para el control ambiental y hormonal de la reproducción.

1.5. AGRADECIMIENTOS

Muchas de las investigaciones que se presentan en esta revisión han sido financiadas por el Ministerio de Educación y Ciencia (proyectos AGL 2001-0593-C03-02, AGL2004-07984-C02-02 y HF2005-0047) y la Junta de Andalucía (Consejería de Presidencia, Ref. A34-02 y AM5-04).



BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, B.A., E.D. VICKERS, C. WARBY, M. PARK, W.H. FISCHER, A.G. CRAIG, J.E. RIVIER, and N.M. SHERWOOD, 2002 Three forms of gonadotropin-releasing hormone, including a novel form, in a basal salmonid, *Coregonus clupeaformis*. *Biol Reprod* 67: 232-239.
- AIZEN, J., I. MEIRI, I. TZCHORI, B. LEVAVI-SIVAN, H. ROSENFELD, 2005 Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *Gen Comp Endocrinol* 142:212-221.
- AMANO, M., Y. OKA, K. AIDA, N. OKUMOTO, S. KAWASHIMA, and Y. HASEGAWA, 1991 Immunocytochemical demonstration of salmon GnRH and chicken GnRH-II in the brain of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *J Comp Neurol* 314: 587-597.
- AMANO, M., Y. OKA, T. YAMANOME, K. OKUZAWA, and K. YAMAMORI, 2002 Three GnRH systems in the brain and pituitary of a pleuronectiform fish, the barfin flounder *Verasper moseri*. *Cell Tissue Res* 309: 323-329.
- ANDERSSON, E., P.G. FJELLDAL, U. KLENKE, E. VIKINGSTAD, G.L. TARANGER, Y. ZOHAR, and S.O. STEFANSSON, 2001 Three forms of GnRH in the brain and pituitary of the turbot, *Scophthalmus maximus*: immunological characterization and seasonal variation. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129: 551-558.
- ANDO, H., P. SWANSON, T. KITANI, N. KOIDE, H. OKADA, H. UEDA, and A. URANO, 2004 Synergistic effects of salmon gonadotropin-releasing hormone and estradiol-17beta on gonadotropin subunit gene expression and release in masu salmon pituitary cells *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol* 137:109-121.
- ANGLADE, I., G. TRAMU, and O. KAH, 1991 Neuroanatomical substrate for dopamine-sGnRH (gonadotropin-releasing hormone) interactions in the forebrain of the goldfish (*Carassius auratus*). p.60 in *Reproductive Physiology of Fish* edited by A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime, and M.S. Rolfe, FishSymp 91, Sheffield.
- ANGLADE, I., H.A. ZANDBERGEN, and O. KAH, 1993 Origin of the pituitary innervation in the goldfish. *Cell Tissue Res* 273: 345-355.
- APARICIO, S., J. CHAPMAN, E. STUPKA, N. PUTNAM, J.M. CHIA, P. DEHAL, A. CHRISTOFFELS, S. RASH, S. HOON, A. SMIT, M.D. GELPKE, J. ROACH, T. OH, I.Y. HO, M. WONG, C. DETTER, F. VERHOEF, P. PREDKI, A. TAY, S. LUCAS, P. RICHARDSON, S.F. SMITH, M.S. CLARK, Y.J. EDWARDS, N. DOGGETT, A. ZHARKIKH, S.V. TAVTIGIAN, D. PRUSS, M. BARNSTEAD, C. EVANS, H. BADEN, J., POWELL, G. GLUSMAN, L., ROWEN, L. HOOD, Y.H. TAN, G. ELGAR, T. HAWKINS, B. VENKATESH, D. ROKHSAR, S. BRENNER, 2002 Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes*. *Science* 297:1301-1310.
- BATTEN, T.F.C., and P.M. INGLETON, 1987 The hypothalamus and the pituitary gland, pp. 285-409 in *Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocri-*



- nology, edited by I. Chester-Jones, P.M. Ingleton and J.G. Phillips. Plenum Press, New York.
- BATTEN, T.F.C., M.L. CAMBRE, L. MOONS, and F. VANDESANDE, 1990 Comparative distribution of neuropeptide-immunoreactive systems in the brain of the green molly, *Poecilia latipinna*. *J Comp Neurol* 302: 893-919.
- BEHRENS, U.D., R.H. DOUGLAS, and H.J. WAGNER, 1993 Gonadotropin-releasing hormone, a neuropeptide of efferent projections to the teleost retina induces light-adaptive spinule formation on horizontal cell dendrites in dark-adapted preparations kept in vitro. *Neurosci Lett* 164: 59-62.
- BENTLEY, G.E., N. PERFITO, K. UKENA, K. TSUTSUI, and J.C. WINGFIELD, 2003 Gonadotropin-inhibitory peptide in song sparrows (*Melospiza melodia*) in different reproductive conditions, and in house sparrows (*Passer domesticus*) relative to chicken-gonadotropin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 15: 794-802.
- BENTLEY, G.E., J.P., JENSEN, G.J. KAUR, D.W. WACKER, K. TSUTSUI, and J.C. WINGFIELD, 2006 Rapid inhibition of female sexual behavior by gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). *Horm Behav* 49: 550-555.
- BHANDARI RK, TANIYAMA S, KITAHASHI T, ANDO H, YAMAUCHI K, ZOHAR Y, UEDA H, URANO A. 2003 Seasonal changes of responses to gonadotropin-releasing hormone analog in expression of growth hormone/prolactin/somatolactin genes in the pituitary of masu salmon. *Gen Comp Endocrinol* 130: 55-63.
- BOGERD, J., K.W. LI, C. JANSSEN-DOMMERHOLT, and H. GOOS, 1992 Two gonadotropin-releasing hormones from African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biochem Biophys Res Commun* 187:127-134.
- BOGERD, J., W.B. DIEPENBROEK, E. HUND, F. VAN OOSTERHOUT, A.C. TEVES, R. LEURS, and M. BLOMENRÖHR, 2002 Two gonadotropin-releasing hormone receptors in the African catfish: no differences in ligand selectivity, but differences in tissue distribution. *Endocrinology* 143: 4673-4682.
- BRETON, B., C. WEIL, B. JALABERT, and R. BILLARD, 1972 Activité réciproque des facteurs hypothalamiques de Béliér (*Ovis aries*) et des poissons téléostéens sur la sécrétion *in vitro* des hormones gonadotropes c-HG et LH respectivement par des hypophyses de carpe et de béliér. *C R Acad Sci (Paris) Sér III* 274: 2530-2533.
- BRETON, B., T. MICOLAJCZYK, W. POPEK, K. BIENARZ, and P. EPLER, 1991 Neuropeptide Y stimulates in vitro gonadotropin secretion in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 84: 277-283.
- BROMAGE, N.R., M.J.R. PORTER, and C.F. RANDALL, 2001 The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197: 63-98.
- BURGUS, R., M. BUTCHER, N. LING, M. MONAHAN, J. RIVIER, R. FELLOWS, M. AMOSS, R. BLACKWELL, W. VALE, R. GUILLEMIN, 1971 Molecular structure of the hypothala-



- mic factor (LRF) of ovine origin monitoring the secretion of pituitary gonadotropic hormone of luteinization (LH). C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D 273: 1611-1613.
- CAHILL, G.M., 1996 Circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina. Brain Res 708:177-181.
- CAROLSFELD, J., J.F.F. POWELL, M. PARK, W.H. FISCHER, A.G. CRAIG, J.P. CHANG, J.E. RIVIER, and N.M. SHERWOOD, 2000 Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, from an ancient teleost, herring. Endocrinology 141:505-512.
- CARRILLO, M., S. ZANUY, F. PRAT, R. SERRANO, and N.R. BROMAGE, 1993 Environmental induction of spawning in sea bass, pp. 43ñ54 in Recent Advances in Aquaculture vol. 4, edited by R.J. Roberts and J. Muir. Blackwell, Oxford.
- CARRILLO, M., S. ZANUY, F. PRAT, J. CERDÁ, J. RAMOS, E. MAÑANÓS, and N. BROMAGE, 1995 Sea bass, pp. 138-168 in Broodstock Management and Egg and Larval Quality, edited by N.R. Bromage and R.J. Roberts. Blackwell, Oxford.
- CERDÁ-REVERTER, J.M., L.A. SORBERA, M. CARRILLO, and S. ZANUY, 1999 Energetic dependence of NPY-induced LH secretion in a teleost fish (*Dicentrarchus labrax*). Am J Physiol 277:1627-1634.
- CERDÁ-REVERTER, J.M., I. ANGLADE, G. MARTINEZ-RODRIGUEZ, D. MAZURAS, J.A. MUÑOZ-CUETO, M. CARRILLO, O. KAH, S. ZANUY, 2000 Characterization of neuropeptide Y expression in the brain of a perciform fish, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). J Chem Neuroanat 19:197-210.
- CHANG, J.E., and R.E. PETER, 1983 Effects of pimozide and Des Gly¹⁰, (D Ala⁶) luteinizing hormone-releasing hormone ethylamide on serum gonadotropin concentration, germinal vesicle migration, and ovulation in female goldfish, *Carassius auratus*. Gen Comp Endocrinol 52: 30-37.
- CHANG, J.P., R.E. COOK, and R.E. PETER, 1983 Influence of catecholamines on gonadotropin secretion in goldfish, *Carassius auratus*. Gen Comp Endocrinol 49: 22-31.
- CHANG, J.P., K.L. YU, A.O. WONG, and R.E. PETER, 1990 Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release *in vitro* in goldfish. Neuroendocrinology 51: 664-674.
- CHANG, J. P., F. VAN GOOR, and S. ACHARYA, 1991 Influences of norepinephrine, and adrenergic agonists and antagonists on gonadotropin secretion from dispersed pituitary cells of goldfish, *Carassius auratus*. Neuroendocrinology 54: 202-210.
- CHANG, J.P., F. VAN GOOR, R.M. JOBIN, and A. LO, 1996 GnRH signaling in goldfish pituitary cells. Biol Signals 5: 70-80.



- CICERO, T.J., P.F. SCHMOEKER, E.R. MEYER, and B.T. MILLER, 1985 Luteinizing hormone releasing hormone mediates naloxone's effects on serum luteinizing hormone in normal and morphine sensitized rats. *Life Sci* 37: 467-474.
- COLLIN, J.P., P. VOISIN, J. FALCÓN, J.P. FAURE, P. BRISSON, and J.R. DEFAYE, 1989 Pineal transducers in the course of evolution: molecular organization, rhythmic metabolic activity and role. *Arch Histol Cytol* 52:441-449.
- CONFENTE, F., M.C. RENDÓN, M.L. GONZÁLEZ DE CANALES, and J.A. MUÑOZ-CUETO, 2005 Neuropeptidergic and aminergic systems in the brain and pituitary of the meagre, *Argyrosomus regius*. pp. 181-185 in *Avanços em Endocrinologia Comparativa Vol. III*, edited by A.V.M. Canario and D.M. Power. CCMAR Universidade do Algarve, Faro.
- CONN, P.M., and W.F. CROWLEY JR., 1994 Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu Rev Med* 45: 391-405.
- COOK, H., J.W. BERKENBOSCH, M.J. FERNHOUT, K.L. YU, R.E. PETER, J.P. CHANG, and J. RIVIER, 1991 Demonstration of gonadotropin-releasing hormone receptors on gonadotrophs and somatotrophs of the goldfish: An electron microscope study. *Regul Peptides* 36: 369-378.
- COON S.L., V. BEGAY, J. FALCÓN, and D.C. KLEIN, 1998 Expression of melatonin synthesis genes is controlled by a circadian clock in the pike pineal organ but not in the trout. *Biol Cell* 90:399-405.
- DANGER, J.M., B. BRETON, A. VALLARINO, G. FOURNIER, G. PELLETIER, and H. VAUDRY, 1991 Neuropeptide Y in the trout brain and pituitary: localization, characterization, and action on gonadotropin release. *Endocrinology* 128: 2360-2368.
- DE LEEUW, R., H.R. HABIBI, C.S. NAHORNIAK, and R.E. PETER, 1989 Dopaminergic regulation of pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor activity in the goldfish (*Carassius auratus*). *J Endocrinol* 121: 239-247.
- DEVAUCHELLE, N., J.C. ALEXANDRE, N. LE CORRE and Y. LETTY, 1987 Spawning of Sole (*Solea solea*) in captivity, *Aquaculture* 66: 125-147.
- DICKEY, J.T., and P. SWANSON, 2000 Effects of salmon Gonadotropin-Releasing Hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen Comp Endocrinol* 118:436-449.
- DONOVAN, B.T., and G.W. HARRIS, 1954 Effect of pituitary stalk section light-induced oestrus in the ferret. *Nature* 174: 503-504.
- DUFOUR, S., F.-A. WELTZIEN, M.-E. SEBERT, N. LE BELLE, B. VIDAL, P. VERNIER, and C. PASQUALINI, 2005 Dopaminergic inhibition of reproduction in teleost fishes: eco-physiological and evolutionary implications. *Ann NY Acad Sci* 1040:9-22.



- EKSTRÖM, P., and J. VANECEK, 1992 Localization of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the brain of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Neuroendocrinology 55:529-537.
- EKSTRÖM, P., and H. MEISSL, 1997 The pineal organ of teleost fishes. Rev Fish Biol Fisheries 7: 199-284.
- EKSTRÖM, P., and H. MEISSL, 2003 Evolution of photosensory pineal organs in new light: the fate of neuroendocrine photoreceptors. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 358: 1679-1700.
- EKSTRÖM, P., T. ÖSTHOLM, and B. I. HOLMQVIST, 1994 Primary visual projections and pineal neural connections in fishes, amphibians and reptiles. Adv Pineal Res 8: 1-18.
- FALCÓN, J., 1999 Cellular circadian clocks in the pineal. Prog Neurobiol 58: 121-162.
- FALCÓN, J., J.B. MARMILLON, B. CLAUSTRAT, and J.P. COLLIN, 1989 Regulation of melatonin secretion in a photoreceptive pineal organ: an *in vitro* study in the pike. J Neurosci 9:1943-1950.
- FALCÓN, J., V. BÉGAY, J. M. GOUJON, P. VOISIN, J. GUERLOTTE, and J.-P. COLLIN, 1994 Immunocytochemical localisation of hydroxyindole-O-methyltransferase in pineal photoreceptor cells of several fish species. J Comp Neurol 341: 559-566.
- FALCÓN J., L. BESSEAU, D. FAZZARI, J. ATTIA, P. GAILDRAT, M. BEAUCHAUD, and G., BOEUF 2003 Melatonin modulates secretion of growth hormone and prolactin by trout pituitary glands and cells in culture. Endocrinology 144: 4648-4658.
- FALCÓN, J., L. BESSEAU, S. SAUZET, and G. BOEUF, 2007a Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. Trends Endocrinol Metabolism 18: 81-88.
- FALCÓN, J., L. BESSEAU, and G. BOEUF, 2007b Molecular and cellular regulation of pineal organ responses, pp. 203-406 in Sensory Systems Neuroscience. Fish Physiology, edited by T. Hara and B. Zielinski. Academic Press Elsevier, Amsterdam.
- FEJÉR, Z. S., Á. SZÉL, P. RÖHLICH, T. GÖRCS, E. MANZANO, M. J. SILVA, and B. VÍGH, 1997 Immunoreactive pinopsin in pineal and retinal photoreceptors of various vertebrates. Acta Biol Hung 48: 463-471.
- FENWICK, J.C., 1970 The pineal organ, photoperiod and reproductive cycles in the goldfish, *Carassius auratus* L. J Endocrinol 46:101-111.
- FERNALD, R.D., and R.B. WHITE, 1999 Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. Front Neuroendocrinol 20: 224-240.
- FILBY, A.L., R. VAN AERLE, J. DUITMAN, C.R. TYLER, 2008 The Kisspeptin/Gonadotropin-Releasing Hormone Pathway and Molecular Signaling of Puberty in Fish. Biol Reprod 78: 278-289.



- FORAN, C.M., and A.H. BASS, 1999 Preoptic GnRH and AVT: axes for sexual plasticity in teleost fish. *Gen Comp Endocrinol* 116:141-152.
- FORSELL, J., P. EKSTRÖM, I. NOVALES FLAMARIQUE, and B. HOLMQVIST, 2001 Expression of pineal ultraviolet- and green-like opsins in the pineal organ and retina of teleosts. *J Exp Biol* 204: 2517-2525.
- GAIKWAD A, K.C. BIJU, P.L. MUTHAL, S. SAHA, and N. SUBHEDAR, 2005 Role of neuropeptide Y in the regulation of gonadotropin releasing hormone system in the forebrain of *Clarias batrachus* (Linn.): immunocytochemistry and high performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometric analysis. *Neuroscience* 133: 267-279.
- GAILDRAT, P., B. RON, and J. FALCÓN, 1998 Daily and circadian variations in 2-[¹²⁵I]-iodomelatonin binding sites in the pike brain (*Esox lucius*). *J Neuroendocrinol* 10:511-517.
- GAILDRAT, P., and J. FALCÓN, 2000 Melatonin receptors in the pituitary of a teleost fish: mRNA expression, 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding and cyclic AMP response. *Neuroendocrinology* 72: 57-66.
- GARCÍA-ALLEGUE, R., J.A. MADRID, and F.J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2001 Melatonin rhythms in European sea bass plasma and eye: influence of seasonal photoperiod and water temperature. *J Pineal Res* 31: 68-75.
- GERN, W.A., and S.S. GREENHOUSE, 1988 Examination of *in vitro* melatonin secretion from superfused trout (*Salmo gairdneri*) pineal organs maintained under diel illumination or continuous darkness. *Gen Comp Endocrinol* 71:163-174.
- GILBEAU, P.M., Y. HOSOBUCHI, and N.M. LEE, 1987 Consequence of dynorphin-A administration on anterior pituitary hormone concentrations in adult male rhesus monkeys. *Neuroendocrinology* 45: 284-289.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, D., MADIGOU, T., N. ZMORA, I. ANGLADE, S. ZANUY, Y. ZOHAR, A. ELIZUR, J.A. MUÑOZ-CUETO, and O. KAH, 2001 Differential expression of three different prepro-GnRH (Gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Comp Neurol* 429: 144-155.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, D., N. ZMORA, E. MAÑANOS, D. SALIGAUT, S. ZANUY, Y. ZOHAR, A. ELIZUR, O. KAH, and J.A. MUÑOZ-CUETO, 2002a Immunohistochemical localization of three different prepro-GnRHs (Gonadotrophin-releasing hormones) in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies against recombinant GAPs. *J Comp Neurol* 446: 95-113.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, D., N. ZMORA, S. ZANUY, C. SARASQUETE, A. ELIZUR, O. KAH, and J.A. MUÑOZ-CUETO, 2002b Developmental expression of three different prepro-GnRH (Gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the



- brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Chem Neuroanat* 23: 255-267.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, D., N. ZMORA, D. SALIGAUT, S. ZANUY, A. ELIZUR, O. KAH, and J.A. MUÑOZ-CUETO, 2004a New insights in developmental origins of different GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) systems in perciform fish: an immunohistochemical study in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J Chem Neuroanat* 28: 1-15.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, D., T. MADIGOU, E. MANANOS, J.M. CERDÁ-REVERTER, S. ZANUY, O. KAH, and J.A. MUÑOZ-CUETO, 2004b Cloning and expression of gonadotropin-releasing hormone receptor in the brain and pituitary of the European sea bass: an in situ hybridization study. *Biol Reprod* 70:1380-1391.
- GOOS, H.J.TH., R. DE LEEUW, C. DE ZOETEN-KAMP, J. PEUTE, and S. BLASER, 1985 Gonadotropin-releasing hormone -immunoreactive neuronal structures in the brain and pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Cell Tissue Res* 241: 593-596.
- GOTHILF, Y., J.A. MUÑOZ-CUETO, C.A. SAGRILLO, M. SELMANOFF, T.T. CHEN, A. ELIZUR, O. KAH, and Y. ZOHAR, 1996 Three forms of gonadotrophin-releasing hormone in a teleost fish: cDNA characterization and brain localization. *Biol Reprod* 55:636-645.
- GUILGUR, L.G., N.P. MONCAUT, A.V. CANARIO, and G.M. SOMOZA, 2006 Evolution of GnRH ligands and receptors in gnathostomata. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 144: 272-283.
- GUILGUR, L.G., G. ORTÍ, P.H. STROBL-MAZZULLA, J.I. FERNANDINO, L.A. MIRANDA, and G.M. SOMOZA, 2007 Characterization of the cDNAs encoding three GnRH forms in the pejerrey fish *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes) and the evolution of GnRH precursors. *J Mol Evol* 64:614-627.
- HABIBI, H.R., and R.E. PETER, 1991 Gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptors in teleost, pp. 109-113 in *Reproductive Physiology of Fish*, edited by A.P. SCOTT, J.P. SUMPTER, D.E. KIME and M.S. ROLFE, FishSymp 91, Sheffield.
- HABIBI, H.R., and D. PATI, 1993 Extrapituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding sites in goldfish. *Fish Physiol Biochem* 11:43-49.
- HALAAS, J.L., K.S. GALIWALA, M. MAFFEI, S.L. COHEN, B.T. CHAIT, D. RABINOWITZ, R.L. LALLONE, S.K. BURLEY, and J.M. FRIEDMAN, 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-546.
- HERRERA-PÉREZ, P., L. BESSEAU, S. SAUZET, G. BOEUF, J. FALCÓN, and J.A. MUÑOZ-CUETO, 2007 Cloning and expression of a MT1 melatonin receptor in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), pp. 67-72 in *Avanços em Endocrinologia Comparativa Vol. III*, edited by A.V.M. Canario and D.M. Power. CCMAR Universidade do Algarve, Faro.



- HIMICK, B.A., A.A. GOLOSINSKI, A.-C. JONSSON, and R.E. PETER, 1993 CCK/Gastrinlike immunoreactivity in the goldfish pituitary: regulation of pituitary hormone secretion by CCK-like peptides *in vitro*. Gen Comp Endocrinol 92: 88-103.
- HOLLAND, M.C.H., Y. GOTHILF, I. MEIRI, J.A. KING, K. OKUZAWA, A. ELIZUR, and Y. ZOHAR, 1998a Levels of the native forms of GnRH in the pituitary of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, at several characteristic stages of the gonadal cycle. Gen Comp Endocrinol 112: 394-405.
- HOLLAND, M.C., S. HASSIN, and Y. ZOHAR, 1998b Effects of long-term testosterone, gonadotropin-releasing hormone agonist, and pimozide treatments on gonadotropin II levels and ovarian development in juvenile female striped bass (*Morone saxatilis*). Biol Reprod 59:1153-1162.
- HOLLAND, M.C.H., S. HASSIN, and Y. ZOHAR, 2001 Seasonal fluctuations in the pituitary levels of the three forms of gonadotropin-releasing hormone in striped bass, *Morone saxatilis* (teleostei), during juvenile and pubertal development. J Endocrinol 169: 527-538.
- HONTELA, A., and R.E. PETER, 1995 Effects of pinealectomy, blinding, and sexual contition on serum gonadotropin levels in the goldfish. Gen Comp Endocrinol 40:168-179.
- HOOVER, E.E., 1937 Experimental modification of the sexual cycle in trout by control of light. Science 86: 425-426.
- LIGO, M., and K. AIDA, 1995 Effects of season, temperature and photoperiod on plasma melatonin rhythms in goldfish, *Carassius auratus*. J Pineal Res 18: 62-68.
- LIGO, M., K. FURUKAWA, M. TABATA, and K. AIDA, 2003 Circadian variations of melatonin binding sites in the goldfish brain. Neurosci Lett 347: 49-52.
- IWAKOSHI, E., K. TAKUWA-KURODA, Y. FUJISAWA, M. HISADA, K. UKENA, K., TSUTSUI, H. MINAKATA, 2002 Isolation and characterization of a GnRH-like peptide from *Octopus vulgaris*. Biochem Biophys Res Commun 291: 1187-1193.
- JIMÉNEZ, A.J., P., FERNÁNDEZ-LLÉBREZ, and J.M. PÉREZ-FIGARES, 1995 Central projections from the goldfish pineal organ traced by HRP-immunocytochemistry. Histol Histopathol 10:847-852.
- JIMENEZ-LIÑÁN, M., B.S. RUBIN, and J.C. KING, 1997 Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain. Endocrinology 138: 4123-4130.
- JOHNSTON, S.A., and L. MALER, 1992 Anatomical organization of the hypophysiotropic systems in the electric fish, *Apteronotus leptorhynchus*. J Comp Neurol 317: 421-437.
- KAH, O., B. BRETON, J. G. DULKA, J. NUÑEZ-RODRIGUEZ, R.E. PETER, A. CORIGAN, J. J. RIVIER, and W. W. VALE, 1986 A reinvestigation of the Gn-RH (Gonadotropin-



- releasing hormone) systems in the goldfish brain using antibodies to salmon Gn-RH. *Cell Tissue Res* 244: 327-337.
- KAH, O., J.G. DULKA, P. DUBOURG, J. THIBAUT, and R.E. PETER, 1987 Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotropin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. *Neuroendocrinology* 45:451-458.
- KAH, O., J.M. DANGER, P. DUBOURG, G. PELLETIER, H. VAUDRY, and A. CALAS, 1989 Characterization, cerebral distribution and gonadotropin-release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiol Biochem* 7: 69-76.
- KAH, O., S. ZANUY, E. MAÑANOS, I. ANGLADE, and M. CARRILLO, 1991 Distribution of salmon gonadotrophin-releasing hormone in the brain and pituitary of the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Cell Tissue Res* 266: 129-136.
- KAH, O., V.L. TRUDEAU, B.D. SLOLEY, P. DUBORG, J.P. CHANG, K.L. YU, and R.E. PETER, 1992 Involvement of GABA in the neuroendocrine regulation of gonadotrophin release in the goldfish. *Neuroendocrinology* 55: 396-404.
- KAH, O., I. ANGLADE, E. LEPRÉTRE, P. DUBOURG, and D. DE MONBRISON, 1993 The reproductive brain in fish. *Fish Physiol Biochem* 11:85-98.
- KAH, O., C. LETHIMONIER, G. SOMOZA, L.G. GUILGUR, C. VAILLANT, J.J. LAREYRE, 2007 GnRH and GnRH receptors in metazoa: A historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol* 153: 346-364.
- KAISER, U.B., A. JAKUBOWIAK, A. STEINBERGER, and W.W. CHIN, 1993 Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels *in vivo* and *in vitro*. *Endocrinology* 133:931-934.
- KAKAR, S.S., L.C. MUSGROVE, D.C. DEVOR, J.C. SELLERS, and J.D. NEILL, 1992 Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 189:289-295.
- KAKIZAWA, S., T. KANEKO, and T. HIRANO, 1997 Effects of hypothalamic factors on somatolactin secretion from the organ-cultured pituitary of rainbow trout. *Gen Comp Endocrinol* 105: 71-78.
- KAWAUCHI, H., M. TUBOKAWA, A. KANEZAWA, and H. KITIGAWA, 1980 Occurrence of two different endorphins in the salmon pituitary. *Biochem Biophys Res Commun* 92: 1278-1288.
- KEZUKA H., K. AIDA, and I. HANYU, 1989 Melatonin secretion from goldfish pineal gland in organ culture. *Gen Comp Endocrinol* 75:217-221.
- KHAKOO, Z., A. BHATIA, L. GEDAMU, and H.R. HABIBI, 1994 Functional specificity for salmon gonadotropin releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II coupled to the gonadotropin release and subunit messenger ribonucleic acid level in the goldfish pituitary. *Endocrinology* 134: 838-847.



- KHAN, I.A., and P. THOMAS, 1991 Stimulatory effects of serotonin on gonadotropin release in the Atlantic croaker, pp. 62 in Reproductive Physiology of Fish, edited by A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime and M.S. Rolfe, FishSymp 91, Sheffield.
- KHAN, I.A., and P. THOMAS, 1996 Melatonin influences gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). Gen Comp Endocrinol 104: 231-242.
- KING, J.A., and R.P. MILLAR, 1982a Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone I. Structural determination on partially purified material. J Biol Chem 257: 10722-10728.
- KING, J.A., and R.P. MILLAR, 1982b Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone II. Isolation and characterization. J Biol Chem 257:10729-10732.
- KING, J.A., S. DUFOUR, Y.A. FONTAINE, and R.P. MILLAR, 1990 Chromatographic and immunological evidence for mammalian GnRH and chicken GnRH II in eel (*Anguilla anguilla*) brain and pituitary. Peptides 11: 507-514.
- KLAUSEN, C., J.P. CHANG, and H.R. HABIBI, 2002 Multiplicity of gonadotropin-releasing hormone signaling: a comparative perspective. Prog Brain Res 141: 111-128.
- KLEIN, D.C., R.Y. MOORE, and S.M. REPERT, 1991 Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock. Oxford University Press, New York.
- KRIEGSFELD, L.J., 2006 Driving reproduction: RFamide peptides behind the wheel. Hormones Behav 50, 655-666.
- KRIEGSFELD, L.J., D.F. MEI, G.E. BENTLEY, T. UBUKA, A.O. MASON, K. INOUE, K. UKENA, K. TSUTSUI, and R. SILVER, 2006 Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. Proc Natl Acad Sci USA 103: 2410-2415.
- KUO, M.W., S.W. LOU, J. POSTLETHWAIT, and B.C. CHUNG, 2005 Chromosomal organization, evolutionary relationship, and expression of zebrafish GnRH family members. J Biomed Sci 12: 629-639.
- KUOHUNG, W., and U.B. KAISER. 2006 GPR54 and KiSS-1: role in the regulation of puberty and reproduction. Rev Endocr Metab Disord 7:257-263.
- LEADEM, C.A., W.R. CROWLEY, J.W. SIMPKINS, and S.P. KALRA, 1985 Effects of naloxone on catecholamine and LHRH release from the perfused hypothalamus of the steroid-primed rats. Neuroendocrinology 40: 497-500.
- LETHIMONIER, C., T. MADIGOU, J.A. MUÑOZ-CUETO, J.J. LAREYRE, and O. KAH, 2004 Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. Gen Comp Endocrinol 135: 1-16.



- LEVAVI-SIVAN, B., A. AVITAN, and T. KANIAS, 2003 Characterization of the inhibitory dopamine receptor from the pituitary of tilapia. *Fish Physiol Biochem* 28:73-75.
- LEVAVI-SIVAN, B., J. BIRAN, and E. FIREMAN, 2006 Sex steroids are involved in the regulation of gonadotropin-releasing hormone and dopamine D2 receptors in female tilapia pituitary. *Biol Reprod* 75: 642-650.
- LI, W.S., H.R. LIN, and A.O. WONG, 2002 Effects of gonadotropin-releasing hormone on growth hormone secretion and gene expression in common carp pituitary. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 132: 335-341.
- LINARD, B., S. BENNANI, and C. SALIGAUT, 1995 Involvement of estradiol in a catecholamine inhibitory tone of gonadotropin release in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 99:192-196.
- LINARD, B., I. ANGLADE, M. CORIO, J.M. NAVAS, F. PAKDEL, C. SALIGAUT, and O. KAH, 1996 Estrogen receptors are expressed in a subset of tyrosine hydroxylase positive neurons of the anterior preoptic region in the rainbow trout. *Neuroendocrinology* 63:156-165.
- LOVEJOY, D.A., W.H. FISCHER, S. NGAMVONGCHON, A.G. CRAIG, C.S. NAHORNIAK, R.E. PETER, J.E. RIVIER, and N.M. SHERWOOD, 1992 Distinct sequence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6373-6377.
- LYNCH, M., and A. FORCE, 2000 The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154: 459-473.
- MAGNI, P., M. MOTTA, and L. MARTINI, 2000 Leptin: a possible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function. *Regul Pept* 92: 51-56.
- MANDADO, M., P. MOLIST, R. ANADÓN, and J. YÁÑEZ, 2001 A Dil-tracing study of the neural connections of the pineal organ in two elasmobranchs (*Scyliorhinus canicula* and *Raja montagui*) suggests a pineal projection to the midbrain GnRH-immunoreactive nucleus. *Cell Tissue Res* 303: 391-401.
- MAÑANOS, E.L., I. ANGLADE, J. CHYB, C., SALIGAUT, B. BRETON, and O. KAH, 1999 Involvement of gamma-aminobutyric acid in the control of GTH-1 and GTH-2 secretion in male and female rainbow trout. *Neuroendocrinology* 69:269-280.
- MARIAN, J., R.L. COOPER, and P.M. CONN, 1981 Regulation of the rat pituitary releasing-hormone receptor. *Mol Pharmacol* 19: 399-405.
- MARSHALL, J.C., R.A. SHAKESPEAR, and W.D. ODELL, 1976 LHRH-pituitary plasma membrane binding: the presence of specific binding sites in other tissues. *Clin Endocrinol* 5: 671-677.
- MARTINOLI, M.G., P. DUBOURG, M. GEFFARD, A. CALAS, and O. KAH, 1990 Distribution of GABA-immunoreactive neurones in the forebrain of the goldfish. *Cell Tissue Res* 260: 77-84.



- MATEOS, J., E. MAÑANÓS, M. CARRILLO, and S. ZANUY, 2002 Regulation of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean sea bass. *Comp Biochem Physiol B* 132: 75-86.
- MATSUO, H., Y. BABA, R.M.G. NAIR, A. ARIMURA, and A.V. SCHALLY, 1971 Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Comm* 43: 1334-1339.
- MAYER, I., C. BORNESTAF, and B. BORG, 1997 Melatonin in non-mammalian vertebrates: physiological role in reproduction? *Comp Biochem Physiol* 118:515-531.
- MAZURAS, D., I. BRIERLEY, I. ANGLADE, J. DREW, C. RANDALL, N. BROMAGE, D. MICHEL, O. KAH, and L.M. WILLIAMS, 1999 Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression. *J Comp Neurol* 409: 313-324.
- MECHALY, A., J. VIÑAS, and F. PIFERRER, 2007 Molecular cloning and sequence characterization of a G protein-coupled receptor (GPR54) in the Senegal sole (*Solea senegalensis*), p109 in 8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, edited by G. Roudaut, C. Labbé and J. Bobe. INRA-Université de Rennes, Saint-Malo.
- MESSAGER, S., E.E. CHATZIDAKI, D. MA, A.G. HENDRICK, D. ZAHN, J. DIXON, R.R. THRESHER, I. MALINGE, D. LOMET, M.B. CARLTON, W.H. COLLEDGE, A. CARATY, and S.A. APARICIO, 2005 Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone secretion via G protein coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1761-1766.
- MILLAR, R., S. LOWE, D. CONKLIN, A. PAWSON, S. MAUDSLEY, B. TROSKIE, T. OTT, M. MILLAR, G. LINCOLN, R. SELLAR, B. FAURHOLM, G. SCOBIE, R. KUESTNER, E. TERASAWA, and A. KATZ, 2001 A novel mammalian receptor for the evolutionarily conserved type II GnRH. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9636-9641.
- MIYAMOTO, K., I. HASEGAWA, M. NOMURA, M. IGARASHI, K. KANGAWA, and H. MATSUO, 1984 Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: Evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3874-3878.
- MOHAMED, J.S., P. THOMAS and I.A. KHAN, 2005 Isolation, cloning, and expression of three prepro-GnRH mRNAs in Atlantic croaker brain and pituitary. *J Comp Neurol* 488: 384-395.
- MOHAMED, J.S., A.D. BENNINGHOFF, G.J. HOLT, and I.A. KHAN, 2007 Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. *J Mol Endocrinol* 38: 235-244.



- MONCAUT, N., G. SOMOZA, D.M. POWER, and A.V. CANARIO, 2005 Five gonadotropin-releasing hormone receptors in a teleost Wsh: isolation, tissue distribution and phylogenetic relationships. *J Mol Endocrinol* 34: 767-779.
- MONTANER, A.D., G.M. SOMOZA, J.A. KING, J.J. BIANCHINI, C.G. BOLIS, and J.M. AFFANNI, 1998 Chromatographic and immunological identification of GnRH (gonadotropin-releasing hormone) variants. Occurrence of mammalian and a salmon-like GnRH in the forebrain of an eutherian mammal: *Hydrochaeris hydrochaeris* (Mammalia, Rodentia). *Regul Pept* 73:197-204.
- MONTANER, A.D., M.K. PARK, W.H. FISCHER, A.G. CRAIG, J.P. CHANG, G.M. SOMOZA, J.E. RIVIER, and N.M. SHERWOOD, 2001 Primary structure of a novel gonadotropin-releasing hormone in the brain of a teleost, pejerrey. *Endocrinology* 142:1453-1460.
- MOUSA, M.A., and S.A. MOUSA, 2003 Immunohistochemical localization of gonadotropin releasing hormones in the brain and pituitary gland of the Nile perch, *Lates niloticus* (Teleostei, Centropomidae). *Gen Comp Endocrinol* 130: 245-255.
- MUÑOZ-CUETO, J.A., M.C. SARASQUETE, Y. ZOHAR, and O. KAH, 2001 An atlas of the brain of the gilthead seabream, *Sparus aurata*. Maryland Sea Grant College. University of Maryland System. 126 pp. Publication Number UM-SG-TS-2001-01.
- MURTHY, C.K., and R.E. PETER, 1994 Functional evidence regarding receptor subtypes mediating the actions of native gonadotropin-releasing hormones (GnRH) in goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 94: 78-91.
- NGAMVONGCHON, S., D.A. LOVEJOY, W.H. FISCHER, A.G. CRAIG, C.S. NAHORNIAK, and N.M. SHERWOOD, 1992 Primary structure of two forms of gonadotropin-releasing hormone, one distinct and one conserved, from catfish brain. *Mol Cell Neurosci* 3: 17-22.
- NOCILLADO, J.N., B. LEVAVI-SIVAN, F. CARRICK, and A. ELIZUR, 2007 Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. *Gen Comp Endocrinol* 150: 278-287.
- OKUBO, K. and K. AIDA, 2001 Gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) in a primitive teleost, the arowana: phylogenetic evidence that three paralogous lineages of GnRH occurred prior to the emergence of teleosts. *Gen Comp Endocrinol* 124:125-133.
- OKUBO, K., M. AMANO, Y. YOSHIURA, H. SUETAKE, and K. AIDA, 2000 A novel form of gonadotropin-releasing hormone in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* 276: 298-303.



- OKUBO, K., S. ISHII, J. ISHIDA, H. MITANI, K. NARUSE, M. KONDO, A. SHIMA, M. TANAKA, S. ASAKAWA, N. SHIMIZU, and K. AIDA, 2003 A novel third gonadotropin-releasing hormone receptor in the medaka *Oryzias latipes*: evolutionary and functional implications. *Gene* 314: 121-131.
- OKUBO, K., F. SAKAI, E.L. LAU, G. YOSHIKAZI, Y. TAKEUCHI, K. NARUSE, K. AIDA, and Y. NAGAHAMA, 2006 Forebrain gonadotropin-releasing hormone neuronal development: insights from transgenic medaka and the relevance to X-linked Kallmann syndrome. *Endocrinology* 147: 1076-1084.
- OKUZAWA, K., M. AMANO, M. KOBAYASHI, K. AIDA, I. HANYU, Y. HASEGAWA, and K. MIYAMOTO, 1990 Differences in salmon GnRH and chicken GnRH-II contents in discrete brain areas of male and female rainbow trout according to age and stage of maturity. *Gen Comp Endocrinol* 80: 116-126.
- OHTAKI, T., Y. SHINTANI, S. HONDA, H. MATSUMOTO, A. HORI, K. KANEHASHI, Y. TERAOKA, S. KUMANO, Y. TAKATSU, Y. MASUDA, Y. ISHIBASHI, T. WATANABE, M. ASADA, T. YAMADA, M. SUENAGA, C. FUJINO, S. USUKI, T. KUROKAWA, H. ONDA, O. NISHIMURA, and M. FUJINO, 2001 Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a Gprotein-coupled receptor. *Nature* 411: 613-617.
- OSUGI, T., K. UKENA, S.A. SOWER, H. KAWAUCHI, and K. TSUTSUI, 2006. Evolutionary origin and divergence of PQRamide peptides and LPXRFamide peptides in the RFamide peptide family. Insights from novel lamprey RFamide peptides. *FEBS J.* 273: 1731-1743.
- PANDOLFI, M., J.A. MUÑOZ-CUETO, F.L. LO NOSTRO, J.D. DOWNS, D.A. PAZ, M.C. MAGGESE, H.F. URBANSKI, 2005 GnRH systems of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae) revisited: a localization study with antibodies and riboprobes to GnRH-associated peptides. *Cell Tissue Res* 321: 219-232.
- PARHAR, I.S., 1997 GnRH in tilapia: three genes, three origins and their roles, pp. 99-122 in *GnRH Neurons: Gene to Behavior*, edited by I.S. Parhar and Y. Sakuma. Brain Shuppan, Tokyo.
- PARHAR, I.S., and M. IWATA, 1994 Gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons project to growth hormone and somatolactin cells in the steelhead trout. *Histochemistry* 102: 195-203.
- PARHAR, I.S., S. OGAWA, and Y. SAKUMA, 2004 Laser captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology* 145: 3613-3618.
- PARHAR, I.S., S. OGAWA, and Y. SAKUMA, 2005 Three GnRH receptor types in laser-captured single cells of the cichlid pituitary display cellular and functional heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 2204-2209.



- PARK, Y.-J., J.-G. PARK, N. HIYAKAWA, Y.-D. LEE, S.-J. KIM, and A. TAKEMURA, 2007 Diurnal and circadian regulation of a melatonin receptor, MT1, in the golden rabbitfish, *Siganus guttatus*. *Gen Comp Endocrinol* 150:253-262.
- PATI, D., and H. R. HABIBI, 2002 Involvement of protein kinase C and arachidonic acid pathways in the gonadotropin-releasing hormone regulation of oocyte meiosis and follicular steroidogenesis in the goldfish ovary. *Biol Reprod* 66: 813-822.
- PENG, C., S. HUMPHRIES, R.E. PETER, J.E. RIVIER, A.G. BLOMQUIST, and D. LARHAMMAR, 1993 Actions of goldfish neuropeptide Y on the secretion of growth Hormone and gonadotropin-II in female goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 90: 306-317.
- PENG, C., W. GALLIN, R.E. PETER, G. BLOMQUIST, and D. LARHAMMAR, 1994 Neuropeptide Y gene expression in the goldfish brain: Distribution and regulation by ovarian steroids. *Endocrinology* 134: 1095-1103.
- PERT, C.B., D. APOSHIAN, and S.H. SNYDER, 1974 Phylogenetic distribution of opiate receptor binding. *Brain Res* 75: 356-361.
- PETER, R.E., and C. PAULENCU, 1990 Involvement of the preoptic region in gonadotropin release-inhibition in goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* 31:133-141.
- PETER R.E., V.L. TRUDEAU, B.D. SLOLEY, C. PENG, and C.S. NAHORNIAK, 1991 Actions of the catecholamines, peptides and sex steroids in regulation of gonadotropin-II in the goldfish, pp. 30-33 in *Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, edited by A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime, y M.S. Rolfe. *FishSymp University of East Anglia, Norwich*.
- PEYON, P., S. ZANUY, and M. CARRILLO, 2001 Action of leptin on *in vitro* luteinizing hormone release in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol Reprod* 65: 1573-1578.
- PHILP, A. R., J. BELLINGHAM, J. M. GARCÍA-FERNANDEZ, and R. G. FOSTER, 2000a A novel rod-like opsin isolated from the extraretinal photoreceptors of teleost fish. *FEBS Lett* 468: 181-188.
- PHILP, A. R., J.M. GARCÍA-FERNANDEZ, B. G. SONI, R. J. LUCAS, J. BELLINGHAM, and R. G. FOSTER, 2000b Vertebrate ancient (VA) opsin and extraretinal photoreception in the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Exp Biol* 203: 1925-1936.
- POMBAL, M.A., J. YÁÑEZ, O. MARÍN, A. GONZÁLEZ, and R. ANADÓN, 1999 Cholinergic and GABAergic neuronal elements in the pineal organ of lampreys, and tract-tracing observations of differential connections of pinealofugal neurons. *Cell Tissue Res* 295: 215-223.



- PONTET, A., J.M. DANGER, P. DUBOURG, G. PELLETIER, H. VAUDRY, A. CALAS, and O. KAH, 1989 Characterization and distribution of neuropeptide Y in the brain of the goldfish. *Cell Tissue Res* 255: 529-538.
- POPEK, W., B. BRETON, W. PIOTROWSKI, K. BIENIARZ, and P. EPLER, 1994 The role of the pineal gland in the control of circadian pituitary gonadotropin release rhythmicity in mature female carp. *Neuroendocrinol Lett* 16:183-193.
- POWELL, J.F.F., Y. ZOHAR, A. ELIZUR, M. PARK, W.H. FISCHER, A.G. CRAIG, J.E. RIVIER, D.A. LOVEJOY, and N.M. SHERWOOD, 1994 Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12081-12085.
- POWELL, J.F.F., S.L. KRUECKL, P.M. COLLINS, and N.M. SHERWOOD, 1996a Molecular forms of GnRH in three model fishes: rockfish, medaka and zebrafish. *J Endocrinol* 150:17-23.
- POWELL, J.F.F., S. RESKA-SKINNER, M.O. PRAKASH, W.H. FISHER, M. PARK, J.E. RIVIER, A.G. CRAIG, G.O. MACKIE, and N.M. SHERWOOD, 1996b Two new forms of gonadotropin-releasing hormone in a protochordate and the evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10461-10464.
- POWELL, J.F.F., E.M. STANDEN, J. CAROLSFELD, M.I. BORELLA, R. GAZOLA, W.H. FISCHER, M. PARK, A.G. CRAIG, C.M. WARBY, J.E. RIVIER, M.V. VAL-SELLA, and N.M. SHERWOOD, 1997 Primary structure of three forms of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the pacu brain. *Regul Pept* 68: 189-195.
- PRAT, F., S. ZANUY, and M. CARRILLO, 2001 Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue GnRHa and pimozide on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture* 198: 325-338.
- PRICE, D.A., and M.J. GREENBERG, 1977 Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science* 197: 670-671.
- RAHMAN, S., M. MORITA, A. TAKEMURA, and K. TACAÑO, 2003 Hormonal changes in relation to lunar periodicity in the testis of the forktail rabbitfish, *Siganus argenteus*. *Gen Comp Endocrinol* 131: 302-309.
- RALPH, M.R., R.G. FOSTER, F.C. DAVIS, and M. MENAKER, 1990 Transplanted supra-chiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* 247:975-978.
- RAMOS, J. 1985 Influencia del fotoperiodo en el ciclo reproductor del lenguado (*Solea solea* L.). *Cuad Marisq Publ Téc*, 9: 314.
- RANDALL, C.F., N.R. BROMAGE, J.E. THORPE, M.S. MILES, and J.S. MUIR, 1995 Melatonin rhythms in Atlantic salmon (*Salmo salar*) maintained under natural and out-of-phase photoperiods. *Gen Comp Endocrinol* 98:73-86.
- RASTOGI, R.K., B. DIANIello, C. PINELLI, M. FIORENTINO, M.M. DI FIORE, M. DI MEGLIO, and L. IELA, 2001 FMRamide in the amphibian brain: a comprehensive survey. *Micros Res Tech* 54: 158-172.



- REITER, R.J., 1991 Melatonin: the chemical expression of darkness. *Mol Cell Endocrinol* 79: 153-159.
- REITER, R.J., 1993 The melatonin rhythm: Both a clock and a calendar. *Experientia* 49:654-664.
- ROA, J., and M. TENA-SEMPERE, 2007 KiSS-1 system and reproduction: Comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *Gen Comp Endocrinol* 153: 132-140.
- RODRÍGUEZ, L., M. CARRILLO, L.A. SORBERA, M.A. SOUBRIER, E. MAÑANÓS, M.C. HOLLAND, Y. ZOHAR, and S. ZANUY, 2000 Pituitary levels of three forms of GnRH in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during sex differentiation and first spawning season. *Gen Comp Endocrinol* 120: 67-74.
- RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F.J., M.C. RENDÓN, C. SARASQUETE, and J.A. MUÑOZ-CUETO. 1999 Distribution of gonadotropin-releasing hormone immunoreactive systems in the brain of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*. *Histochem J* 31: 695-703.
- RODRÍGUEZ-GÓMEZ, F.J., C. RENDÓN-UNCETA, C. SARASQUETE, and J.A. MUÑOZ-CUETO, 2001 Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the brain of the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Anat Rec* 262: 227-237.
- ROSEMBLUM, P.M., and I.P. CALLARD, 1988 The endogenous opioid peptide system in male brown bullhead catfish, *Ictalurus nebulosus* Lesueur: characterization of naloxone binding and the response to naloxone binding during the annual reproductive cycle. *J Exp Zool* 245: 244-255.
- ROSEMBLUM, P.M., and R.E. PETER, 1989 Evidence for the involvement of endogenous opioids in the regulation of gonadotropin secretion in male goldfish, *Carassius auratus*. *Gen Comp Endocrinol* 73: 21-27.
- ROUSSEAU, K., N. LE BELLE, J. MARCHELIDON, and S. DUFOUR, 1999 Evidence that corticotropin-releasing hormone acts as a growth hormone-releasing factor in a primitive teleost, the European eel (*Anguilla anguilla*). *J Neuroendocrinol* 11: 385-392.
- SAITO, D., Y. HASEGAWA, and A. URANO, 2003 Gonadotropin-releasing hormones modulate electrical activity of vasotocin and isotocin neurons in the brain of rainbow trout. *Neurosci Lett* 351: 107-110.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F.J., M. LIGO, J.A. MADRID, S. ZAMORA, and M. TABATA, 1997 Daily cycles in plasma and ocular melatonin in demand-fed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *J Comp Physiol* 167B: 409-415.
- SAUZET, S., L. BESSEAU, P. HERRERA-PÉREZ, D. COVÈS, B. CHATAIN, E. PEYRIC, G. BOEUF, J.A. MUÑOZ-CUETO and J. FALCÓN, 2008 Cloning and retinal expression of melatonin receptors in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Gen Comp Endocrinol* 157:186-195.



- SAWADA, K., K. UKENA, H. SATAKE, E. IWAKOSHI, H. MINAKATA, and K. TSUTSUI, 2002 Novel fish hypothalamic neuropeptide: Cloning of a cDNA encoding the precursor polypeptide and identification and localization of the mature peptide. *Eur J Biochem* 269:6000-6008.
- SCHWANZEL-FUKUDA, M., and D.W. PFAFF, 1989 Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338:161-164.
- SCHWANZEL-FUKUDA, M. 1999 Origin and migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in mammals. *Microsc Res Tech* 44: 2-10.
- SEALFON, S.C., H. WEINSTEIN, and R.P. MILLAR, 1997 Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev* 18: 180-205.
- SENTHILKUMARAN, B., K. OKUZAWA, K. GEN, T. OOKURA, and H. KAGAWA. 1999 Distribution and seasonal variation in levels of three native GnRHs in the brain and pituitary of perciform fish. *J. Neuroendocrinol* 11: 181-186.
- SEONG, J.Y., S.S. KANG, K. KAM, Y.G. HAN, H.B. KWON, K. RYU, and K. KIM, 1998 Differential regulation of gonadotropin releasing-hormone (GnRH) receptor expression in the posterior mediobasal hypothalamus by steroid hormones: implication of GnRH neuronal activity. *Brain Res Mol Brain Res* 53: 226-235.
- SERVILI, A., P. HERRERA, M.C. RENDÓN, M.J. BAYARRI, F.J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, and J.A. MUÑOZ-CUETO, 2005 Estudio morfofuncional de la glándula pineal de la lubina: análisis de sus conexiones eferentes y aferentes, pp. 175-180 in *Avances en Endocrinología Comparada, Volumen II*, edited by J.P. Castaño, M.M. Malagón, S. García Navarro. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba.
- SERVILI, A., J.F. LÓPEZ-OLMEDA, P. HERRERA, F.J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, and J.A. MUÑOZ-CUETO, 2007 Gonadotrophin-releasing hormone modulates the secretion of melatonin in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, pp. 89-93 in *Avanços em Endocrinologia Comparativa Vol. III*, edited by A.V.M. Canário and D.M. Power. CCMAR Universidade do Algarve, Faro.
- SHERWOOD, N., L. EIDEN, M. BROWNSTEIN, J. SPIESS, J. RIVIER, and W. VALE, 1983 Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2794-2798.
- SHERWOOD, N.M., R.T. ZOELLER, and F.L. MOORE, 1986 Multiple forms of gonadotropin-releasing hormone in amphibian brains. *Gen Comp Endocrinol* 61:313-322.
- SILVERSTEIN, J.T., J. BREININGER, D.G. BASKIN, and E.M. PLISETSKAYA, 1998 Neuropeptide Y-like gene expression in the salmon brain increases with fasting. *Gen Comp Endocrinol* 110:157-165.



- SLOLEY, B.D., O. KAH, V.L. TRUDEAU, J.G. DULKA, and R.E. PETER, 1992 Amino acid neurotransmitters and dopamine in brain and pituitary of the goldfish: involvement in the regulation of gonadotropin secretion. *J Neurochem* 58: 2254-2262.
- SOMOZA, G. M., and R. E. PETER, 1991 Effects of serotonin on gonadotropin and growth hormone release from *in vitro* perfused goldfish pituitary fragments. *Gen Comp Endocrinol* 82: 103-110.
- SOMOZA, G.M., D.W. LESCHIED, L.A. MIRANDA, F.L. LO NOSTRO, L., MAGLIULO-CEPRANO A.D. MONTANER, M.P. SCHREIBMAN, J.E. RIVIER, and N.M. SHERWOOD, 2002 Expression of pejerrey gonadotropin releasing hormone (pjGnRH) in three orders of fish. *Biol Reprod* 67:1864-1871.
- SOWER, S.A., Y.C. CHIANG, S. LOVAS, and J.M. CONLON, 1993 Primary structure and biological activity of a third gonadotropin-releasing hormone from lamprey brain. *Endocrinology* 132: 1125-1131.
- STEFANO, A.V., P.G. VISSIO, D.A. PAZ, G.M. SOMOZA, M.C. MAGGESE, and G.E. BARRANTES, 1999 Colocalization of GnRH binding sites with gonadotropin-, somatotropin-, somatolactin-, and prolactin-expressing pituitary cells of the pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol* 116: 133-139.
- TANIYAMA, S., T. KITAHASHI, H. ANDO, M. KAERIYAMA, Y. ZOHAR, H. UEDA, and A. Urano, 2000 Effects of gonadotropin-releasing hormone analog on expression of genes encoding the growth hormone/prolactin/somatolactin family and a pituitary-specific transcription factor in the pituitaries of prespawning sockeye salmon. *Gen Comp Endocrinol* 118: 418-424.
- TATEMOTO, K., 1982 Neuropeptide Y: complete amino acid sequence of the brain peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 5485-5489.
- TENA-SEMPERE, M., 2006 GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Hum Reprod Update* 12: 631-639.
- TROSKIE, B., N. ILLING, E. RUMBAL, Y.M. SUN, J. HAPGOOD, S. SEALFON, D. CONKLIN, and R.P. MILLAR, 1998 Identification of three putative GnRH receptor subtypes in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 112: 296-302.
- TRUDEAU, V.L., 1997 Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev Reprod* 2: 55-68.
- TRUDEAU, V.L., B.D. SLOLEY, A.O.L. WONG, and R.E. PETER, 1993 Interactions of gonadal steroids with brain dopamine and gonadotropin-releasing hormone in the control of Gonadotropin-II secretion in the goldfish. *Gen Comp Endocrinol* 89: 39-50.
- TSUTSUI, K., and K. UKENA, 2006 Review: Hypothalamic LPXRF-amide peptides in vertebrates: identification, localization and hypophysiotropic activity. *Peptides* 27: 1121-1129.



- TSUTSUI, K., E. SAIGOH, K. UKENA, H. TERANISHI, Y. FUJISAWA, M. KIKUCHI, S. ISHII, and P.J. SHARP, 2000 A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 661-667.
- TSUTSUI, K., G.E. BENTLEY, T. UBUKA, E. SAIGOH, H. YIN, T. OSUGI, K. INOUE, V.S. CHOWDHURY, K. UKENA, N.CICCONE, P.J. SHARP, and J.C. WINGFIELD, 2007 The general and comparative biology of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). *Gen Comp Endocrinol* 153: 365-370.
- TSUTSUMI, M., W. ZHOU, R.P. MILLAR, P.L. MELLON, J.L. ROBERTS, C.A. FLANAGAN, K. DONG, B. GILLO, and S.C. SEALFON. 1992 Cloning and functional expression of a mouse gonadotropin-releasing hormone receptor. *Mol Endocrinol* 6:1163-1169.
- UMINO, O., and J.E.DOWLING, 1991 Dopamine release from interplexiform cells in the retina: effects of GnRH, FMRFamide, bicuculline, and enkephalin on horizontal cell activity. *J Neurosci* 11: 3034-3046.
- VACHER, C., E.L. MAÑANÓS, B. BRETON, M.H. MARMIGNON, and C. SALIGAUT, 2000 Modulation of pituitary dopamine D1 or D2 receptors and secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the annual reproductive cycle of female rainbow trout. *J. Neuroendocrinol* 12: 1219-1226.
- VAN AERLE, R., P. KILLE, A. LANGE, and C.R. TYLER, 2008 Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides* 29: 57-64.
- VAN ASSELT, L.A., H.J. GOOS, W. SMIT-VAN DIJK, P.A.M. SPEETJENS, and P.G. VAN OORDT, 1988 Evidence for the involvement of D2 receptors in the dopaminergic inhibition of gonadotropin release in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture*; 72:369-378.
- VERA, L. M., C. DE OLIVEIRA, J. F. LÓPEZ-OLMEDA, J. RAMOS, E. MAÑANÓS, J. A. MADRID, and F. J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2007 Seasonal and daily plasma melatonin rhythms and reproduction in Senegal sole kept under natural photoperiod and natural or controlled water temperature. *J Pineal Res* 43:50-55.
- VETILLARD, A., C. ATTEKE, C. SALIGAUT, P. JEGO, and T. BAILHACHE, 2003 Differential regulation of tyrosine hydroxylase and estradiol receptor expression in the rainbow trout brain. *Mol Cell Endocrinol* 199:37-47.
- VICKERS, E.D., F. LABERGE, B.A. ADAMS, T.J. HARA, and N.M. SHERWOOD, 2004 Cloning and localization of three forms of gonadotropin-releasing hormone, including the novel whitefish form, in a salmonid, *Coregonus clupeaformis*. *Biol Reprod* 70: 1136-1146.
- VIDAL, B., C. PASQUALINI, N. LE BELLE, M.C.H. HOLLAND, M. SBAIHI, P. VERNIER, Y. ZOHAR, and S. DUFOR, 2004 Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biol Reprod* 71:1491-1500.



- VOLKOFF, H., and R.E. PETER, 1999 Actions of two forms of gonadotropin releasing hormone and a GnRH antagonist on spawning behavior of the goldfish *Carassius auratus*. Gen Comp Endocrinol 116: 347-355.
- WANG, L., J. BOGERD, H.S. CHOI, J.Y. SEONG, J.M. SOH, S.Y. CHUN, M. BLOMENROHR, B.E. TROSKIE, R.P. MILLAR, W.H. YU, S.M. McCANN, and H.B. KWON, 2001 Three distinct types of GnRH receptor characterized in the bullfrog. Proc Natl Acad Sci USA 98: 361-366.
- WEBER, G.M., J.F.F. POWELL, M. PARK, W.H. FISCHER, A.G. CRAIG, J.E. RIVIER, U. NAKORN, I.S. PARHAR, S. NGAMVONGCHON, E.G. GRAU, and N.M. SHERWOOD, 1997 Evidence that gonadotropin releasing hormone (GnRH) functions as a prolactin releasing factor in a teleost fish (*Oreochromis mossambicus*) and primary structure for three native GnRH molecules. J Endocrinol 155:121-132.
- WEIL, C., F. CARRE, O. BLAISE, B. BRETON, and P.Y. LE BAIL, 1999 Differential effect of insulin-like growth factor I on *in vitro* gonadotropin (I and II) and growth hormone secretions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of the reproductive cycle. Endocrinology 140:2054-2062.
- WELTZIEN, F.-A., C. PASQUALINI, M.-E. SÉBERT, B. VIDAL, N. LE BELLE, O. KAH, P. VERNIER, and S. DUFOUR, 2006 Androgen-dependent stimulation of brain dopaminergic systems in the female European eel (*Anguilla anguilla*). Endocrinology 147: 2964-2973.
- WHITE, R.B., and R.D. FERNALD, 1998 Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression reveals a distinct origin for GnRH containing neurons in the midbrain. Gen Comp Endocrinol 112: 322-329.
- WHITE, S.A., T.L. KASTEN, C.T. BOND, J.P. ADELMAN, and R.D. FERNALD, 1995 Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel role for an ancient peptide. Proc Natl Acad Sci USA 92: 8363-8367.
- WHITE, S.A., T. NGUYEN, and R.D. FERNALD, 2002 Social regulation of gonadotropin-releasing hormone. J Exp Biol 205: 2567-2581.
- YAHALOM, D., A. CHEN, N. BEN-AROYA, S. RAHIMPOUR, E. KAGANOVSKY, E. OKON, M. FRIDKIN, and Y. KOCH, 1999 The gonadotropin-releasing hormone family of neuropeptides in the brain of human, bovine and rat: identification of a third isoform. FEBS Lett 463: 289-294.
- YÁÑEZ, J., and R. ANADÓN, 1998 Neural connections of the pineal organ in the primitive bony fish *Acipenser baeri*: a carbocyanine dye tract-tracing study. J Comp Neurol 398:151-161.
- YARON, Z., G. GUR, P. MELAMED, H. ROSENFELD, A. ELIZUR, and B. LEVAVI-SIVAN, 2003 Regulation of fish gonadotropins. Int Rev Cytol 225:131-185.
- YIN, H., K. UKENA, T. UBUKA, K. and TSUTSUI, 2005 A novel G protein-coupled receptor for gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix*



- japonica*): identification, expression and binding activity. J Endocrinol 184: 257-266.
- YOO, M.S., H.M. KANG, H.S. CHOI, J.W. KIM, B.E. TROSKIE, R.P. MILLAR, and H.B. KWON, 2000. Molecular cloning, distribution and pharmacological characterization of a novel gonadotropin-releasing hormone ([Trp⁸] GnRH) in frog brain. Mol Cell Endocrinol 164:197-204.
- YU, K. L., and R. E. PETER, 1992 Adrenergic and dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone release from goldfish preoptic-anterior hypothalamus and pituitary *in vitro*. Gen Comp Endocrinol 85: 136-146.
- YU, K.L., N.M. SHERWOOD, and R.E. PETER, 1988 Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*). Peptides 9: 625-630.
- YU, K.L., P.M. ROSENBLUM, and R.E. PETER, 1991 *In vitro* release of gonadotropin-releasing hormone from the brain preoptic-anterior hypothalamic region and pituitary of female goldfish (*Carassius auratus*). Gen Comp Endocrinol 81: 256-267.
- YU, W.H., M. KIMURA, A. WALCZEWSKA, S. KARANTH, and S.M. MCCANN, 1997 Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. Proc Natl Acad Sci USA 94:1023-1028.
- YU, K.L., M.L. HE, C.C. CHIK, X.W. LIN, J.P. CHANG, and R.E. PETER, 1998 mRNA expression of gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) and GnRH receptor in goldfish. Gen Comp Endocrinol 112: 303-311.
- ZACHMANN, A., J. FALCÓN, S.C. KNIFF, V. BOLLIET, and M.A. ALI, 1992 Effects of photoperiod and temperature on rhythmic melatonin secretion from the pineal organ of the white sucker (*Catostomus commersoni*) *in vitro*. Gen Comp Endocrinol 86:26-33.
- ZANUY, S., F. PRAT, M. CARRILLO, and N. BROMAGE, 1995 Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17 β -oestradiol levels of sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Aquat Liv Res 8: 147-152.
- ZHANG, Y., R. PROENCA, M. MAFFEI, M. BARONI, L. LEOPOLD, and J.M. FRIEDMAN, 1994 Positioning cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature 372: 425-432.
- ZHANG, L., N.L. WAYNE, N.M. SHERWOOD, H.R. POSTIGO, and P.S.TSAI, 2000 Biological and immunological characterization of multiple GnRH in an opisthobranch mollusk, *Aplysia californica*. Gen Comp Endocrinol 118: 77-89.
- ZOHAR, Y., A. ELIZUR, N.M. SHERWOOD, J.F. POWELL, J.E. RIVIER, and N. ZMORA. 1995 Gonadotropin-releasing activities of the three native forms of gonadotropin-releasing hormone present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. Gen Comp Endocrinol 97: 289-299.
- ZOHAR, Y., and C.C. MYLONAS, 2001 Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture 197: 99-136.

2

REGULACIÓN Y CONTROL HORMONAL DEL PROCESO REPRODUCTOR DE LOS TELEÓSTEOS





REGULACIÓN Y CONTROL HORMONAL DEL PROCESO REPRODUCTOR DE LOS TELEÓSTEOS

S. Zanuy *, M. Carrillo, A. Rocha, G. Molés

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC)

Resumen

La comprensión de los mecanismos que regulan la función reproductora de los peces teleósteos y su control es un requisito esencial en cultivo de peces. La hipófisis de los peces secreta dos gonadotrofinas, la FSH y la LH que son responsables de que la recrudescencia gonadal tenga lugar. La acción de las gonadotrofinas sobre la gónada se ejerce a través de su acoplamiento a receptores de membrana específicos localizados en las células foliculares y en las de Leydig y Sertoli en el ovario y testículo, respectivamente. El testículo de los peces teleósteos está constituido por dos compartimentos, el lobular y el intersticial. El primero lo constituyen los espermatocistes formados por células germinales y células de Sertoli que las engloban y rodean. En el segundo se localizan las células de Leydig responsables de la producción de esteroides gonadales. La unidad esencial del ovario es el folículo constituido por el oocito, la envoltura vitelina y las dos capas foliculares que lo circundan. El acoplamiento de las gonadotrofinas a sus receptores específicos desencadena la esteroidogénesis gonadal responsable de la producción de andrógenos, estrógenos y progestágenos que a su vez, desencadenan la espermatogénesis y ovogénesis. En cautividad la ausencia de determinados factores bióticos y abióticos puede provocar al-



teraciones del mecanismo reproductor de los teleósteos que dan como resultado ausencia de puestas o asincronismo de las mismas. El objetivo de esta revisión es proporcionar los conocimientos precisos sobre las hormonas reproductivas, su función y su modo de acción sobre los órganos diana (gónadas), para poder controlar la reproducción de los peces en cautividad y así mitigar o eliminar los problemas mencionados anteriormente.

Abstract

The understanding of the mechanisms that regulate the reproductive function of teleosts is an essential requirement in fish culture. The fish hypophysis secretes two gonadotropins, the FSH and LH that are responsible for gonadal recrudescence. Gonadotropin act on the gonad throughout specific membrane receptors located in the ovarian follicular cells and in the testicular Sertoli and Leydig cells. Two main compartments are found in the testicle, the lobular and the interstitial. The first one is constituted by the germinal cell surrounded by the Sertoli cells, giving rise to the spermatocysts. The Leydig cells are located in the second compartment and are responsible for steroid secretion. The essential unity of the ovary is the follicle which is constituted by the oocyte and its viteline and follicular envelops. The binding of the gonadotropins to its specific membrane receptors results in gonadal steroidogenesis. The production of androgens, estrogens and progestagens triggers spermatogenesis and ovogenesis. In captivity, the lack of certain biotic and abiotic factors may account for alterations on the reproductive mechanism of teleosts, resulting in failure or asynchrony of gamete production and release. This review aims to provide essential knowledge on the hormones involved in fish reproduction, their function and way of action on the target organs. This Knowledge will make possible to control reproduction in captivity and diminish or eliminate the above mentioned problems.

2.1. INTRODUCCIÓN

Los peces viven en un medio, el acuático, que experimenta cambios cíclicos muy marcados que afectan de manera sustancial a diversos procesos vitales, como el reproductor, que son fundamentales



para su supervivencia. Para ello, las diversas especies han desarrollado una serie de mecanismos que les permite captar estos cambios ambientales y/o estímulos y traducirlos, convenientemente, para que el organismo de la respuesta fisiológica adaptativa adecuada. Esta suele ser cíclica y en sincronía con los cambios abióticos y bióticos que experimenta el ecosistema en que habitan. En los peces, como en otros vertebrados, compiten con éxito dos sistemas complementarios de información, el sistema neural y el hormonal u endocrino. Para el control adecuado del proceso reproductor es fundamental la conjunción y exacta sincronía entre los dos que se lleva a cabo a través del sistema neuroendocrino. Así pues, la percepción de los estímulos ambientales esta regida por el sistema nervioso que integra la información captada por los receptores sensoriales. En el caso del proceso reproductor esta es integrada y transportada a la hipófisis mediante neurohormonas, principalmente de origen hipotálamico, que a su vez controlan y modulan la síntesis y liberación de las hormonas gonadotropas o gonadotrofinas, responsables de que tenga lugar la recrudescencia gonadal con la consiguiente producción de los gametos. Estas, a su vez, ejercerán su control sobre las gónadas, testículos y ovarios para que sintetizen, principalmente, esteroides gonadales que en último término serán responsables de la producción de los gametos.

En este capítulo no haremos hincapié en el control neuroendocrino de la reproducción de los teleósteos, puesto que ya ha sido exhaustivamente revisado en el capítulo precedente. Nuestro interés se dirigirá hacia la revisión de los mecanismos que intervienen en el control hormonal de su proceso reproductor con especial énfasis en las gonadotrofinas (GTHs), secretadas por la adenohípofisis y en sus receptores de membrana específicos, localizados en las células somáticas de las gónadas. La estructura y función de las gónadas será también motivo de atención por ser el soporte y origen de los elementos germinales además del lugar donde, tras el acoplamiento de las gonadotrofinas a sus receptores, tiene lugar la esteroideogénesis (producción de esteroides gonadales) que regula la producción y emisión de los espermatozoides y óvulos por parte del testículo y ovario, respectivamente.



En acuicultura la imposibilidad de controlar el proceso reproductor de una determinada especie de pez en cautividad limita totalmente sus posibilidades de producción. Por otra parte, la cautividad casi siempre introduce variaciones respecto a las condiciones naturales que favorecen o determinan la reproducción de la especie en cuestión. Ello generalmente se traduce en alteraciones del mecanismo reproductor que pueden provocar mermas en la fecundidad o calidad de las puestas en los casos más sencillos y esterilidad total en los casos más extremos. Por tanto, para evitar estos problemas es preciso un control eficaz de este proceso. Ello requiere de un conocimiento, lo más preciso posible, de los procesos básicos que regulan la alternancia del ciclo reproductor y su puesta en funcionamiento que es lo que pretendemos proporcionar con esta revisión.

2.2. LAS GONADOTROFINAS

La reproducción de los teleósteos implica a una cadena temporal de acontecimientos complejos en los que las gonadotrofinas (GTHs) hipofisarias tienen un papel central. Por ello el conocimiento de su estructura y de modo de acción es indispensable a la hora de comprender como se orquesta el control del proceso reproductor.

2.2.1. La dualidad de las gonadotrofinas de los peces

Durante muchos años se pensó que en la hipófisis de los peces existía una sola gonadotrofina, también llamada madurativa, a la que se le atribuía la regulación de todo el proceso reproductor (Burzawa-Gerard 1982). A mediados de la década de los 70 Idler y Ng (1983) propusieron un sistema dual para las gonadotrofinas de los teleósteos. Sin embargo, esta dualidad no quedó totalmente establecida hasta finales de la década de los 80 con la identificación de dos gonadotrofinas, químicamente diferentes, en la hipófisis de *Onchorhynchus keta* la GTH-I y la GTH-II, previamente conocida como gonadotrofina madurativa (Kawauchi *et al.*, 1989). Posteriormente y en base a las secuencias aminoacídicas, se estableció la homología entre la GTH-I y la GTH-II de los peces con la FSH (hormona foliculoestimulante) y la LH (hormona luteinizante) de los tetrápodos, respectivamente (Li and Ford, 1998; Quérat *et al.*, 2000).



Hasta el presente, gracias a técnicas de biología molecular, se han aislado y caracterizado las secuencias de cDNA que codifican ambas GTHs en mas de 30 especies de peces, representadas en nueve ordenes de teleósteos (Anguiliformes, Salmoniformes, Cipriniformes, Siluriformes, Ciprinodontiformes, Perciformes, Scorpaeniformes, Gasterosteiformes y Pleuronectiformes), así como en Elasmobranquios. Por tanto, la dualidad de las gonadotrofinas debe considerarse como una característica ubicua entre los peces (Yaron y Sivan, 2006).

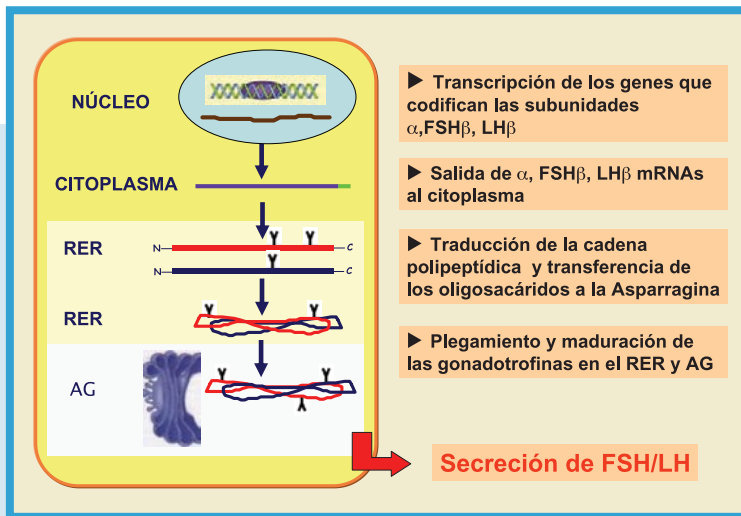
2.2.2. Estructura de las gonadotrofinas

Estructuralmente las GTHs de los peces al igual que las de los mamíferos, son glicoproteínas heterodiméricas que en una misma especie comparten una subunidad α común unida de forma no covalente a una subunidad β específica. Esta subunidad es quien determina la especificidad biológica de la hormona (Boime y Ben-Menahem, 1999). Cada subunidad, α , FSH β y LH β esta codificada por un gen diferente (Fiddes y Talmadge, 1984) y difiere en su secuencia de aminoácidos (aas) y conservación filogenética. Los pesos moleculares estimados en diferentes especies de teleósteos oscilan entre 12-28 KDa para las subunidades y 28-50 KDa para los dímeros, según el método de determinación empleado. Los modelos de la estructura terciaria de las subunidades gonadotropas de peces sugieren que al igual que las hormonas glicoproteicas de mamíferos, pertenecen a una superfamilia de proteínas caracterizadas por la presencia de un nudo de cisteínas (Cys) que consiste en la colocación común de seis Cys que forman tres puentes disulfuro intracatenarios (Hearn y Gomme, 2000). La contribución de estos nudos de Cys es crítica para el correcto plegamiento y dimerización de estas hormonas. Otra característica relevante de la estructura terciaria de las subunidades β es la región denominada «seat belt». Esta región, bien conservada en las hormonas glicoproteicas, parece estar implicada en la transducción de la señal y en la estabilización del heterodímero mediante interacciones no covalentes con la subunidad α (Hearn y Gomme, 2000). Solo el heterodímero intacto α/β es capaz de unirse específicamente a su receptor localizado en la membrana plasmática de las células diana, siendo las subunidades por si solas biológicamente inactivas (Pierce y Parsons, 1981).



Las secuencias de aas de las subunidades LH β de peces están altamente conservadas, particularmente en regiones importantes para la interacción con el receptor (Moyle *et al.*, 1994). En la subunidad LH β , las posiciones de 12 Cys y del único sitio potencial de N-glicosilación están altamente conservadas en todos los vertebrados. Sin embargo, las estructuras primarias de las subunidades FSH β son mas variables incluso en regiones que parecen conferir especificidad de ligando. En la mayoría de los peces teleósteos, excepto en los más primitivos, la FSH β se desvía de la estructura básica de 12 residuos Cys conservados y dos sitios potenciales de N-glicosilación presentes en tetrápodos. Así, a la FSH β de salmónidos y perciformes le faltan la tercera Cys conservada y el segundo sitio potencial de N-glicosilación y tiene una Cys adicional cerca del extremo N-terminal. Esta variación estructural entre las subunidades FSH β de peces, en esta región, podría implicar diferencias funcionales considerables entre especies, debido a su influencia en las interacciones con el receptor y posiblemente en la estabilidad del heterodímero. Además, la pérdida del segundo sitio de N-glicosilación podría afectar a su potencia biológica (Swanson *et al.*, 2003).

La porción glicosídica contribuye entre un 20 y un 40 % en el peso molecular de las gonadotrofinas y desempeña un papel importante en muchas de las características funcionales de las mismas. Los hidratos de carbono de las hormonas glicoproteicas influyen en el correcto plegamiento de las subunidades, en el ensamblaje y maduración conformacional del dímero, en el almacenamiento intracelular y secreción, en la unión a su receptor y transducción de la señal y en su vida media (Hearn y Gomme, 2000 y Ulloa-Aguirre *et al.*, 2001). El proceso de glicosilación empieza en el Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) y termina en el Aparato de Golgi (AG), donde finalmente se obtiene la proteína madura con las modificaciones post-traduccionales necesarias para ser secretada al torrente sanguíneo (Fig. 1). Los oligosacáridos establecen dos tipos de uniones con las proteínas, N-glucosídicas entre el nitrógeno amida de un resto Asn (Asparagina) y la N-acetilglucosamina del oligosacárido y O-glucosídicas entre el grupo OH de una Ser o Thr (Serina o Treonina) y la N-acetilgalactosamina, galactosa, manosa o xilosa. Los oligosacáridos que intervienen en las uniones N-Glucosídicas

**FIGURA 1.**

Representación esquemática de la biosíntesis de las gonadotropinas por las células gonadotropas de la adenohipófisis.

RER, retículo endoplasmático rugoso. AG, Aparato de Golgi.

suelen presentar un núcleo común, mientras que los unidos por uniones O-Glucosídicas varían en forma y tamaño. La mayoría de estos azúcares son hexosas (manosa, galactosa, fucosa) o sus derivados como las N-acetilhexosaminas y los ácidos urónicos. Además, se han identificado también azúcares complejos como los ácidos siálicos derivados del ácido neuramínico (Ulloa-Aguirre *et al.*, 2001).

2.2.3. Síntesis y secreción

Las gonadotropinas se sintetizan en la hipófisis, concretamente en la adenohipófisis. Estudios inmunocitoquímicos han permitido la localización de las células gonadotropas en la hipófisis de numerosas especies de teleosteos, sobre todo en la *pars distalis proximal* (PDP) y en ocasiones, en el borde de la *pars intermedia* (PI) (Fig. 2). En la hipófisis de peces, a diferencia de los vertebrados superiores, hay ausencia de co-localización celular de FSH y LH y por tanto, ambas hormonas se producen en células gonadotropas distintas (Weltzien *et al.*, 2004).



La síntesis y secreción de las gonadotrofinas esta regulada principalmente por una familia de péptidos cerebrales, las GnRHs, cuya naturaleza y diversidad esta bien estudiada en peces teleósteos (Breton *et al.*, 1972; King y Millard, 1992; Sherwood *et al.*, 1993; Lethimonier *et al.* 2004; Kah *et al.*, 2007). Las GnRHs representan el principal factor liberador de gonadotrofinas y son producidas en neuronas presentes en diferentes áreas del cerebro que acceden a la hipófisis a través de conexiones neuronales directas. Tras unirse a receptores específicos en las membranas de las células gonadotropas adenohipofisarias (Conn y Crowley, 1994), desencadenan una serie de reacciones intracelulares que estimulan la síntesis (transcripción y traducción) y secreción de las GTHs. No obstante, existen otros factores cerebrales que modulan

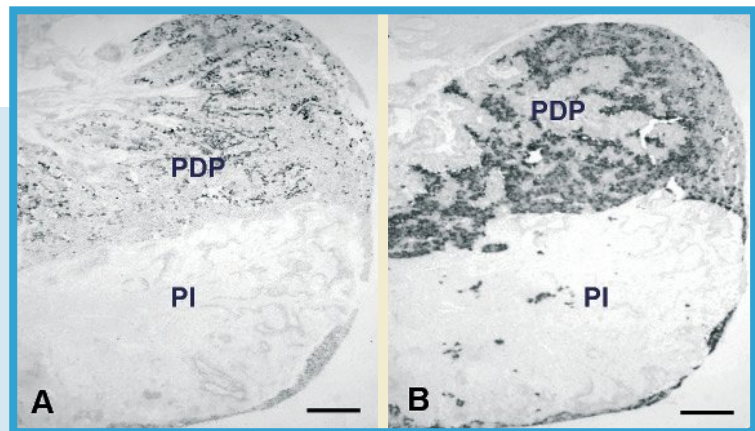


FIGURA 2.

Localización de los dos tipos de células gonadotropas de la lubina (*Dicentrarchus labrax*). Fotomicrofotografías de una sección de la pituitaria mostrando dos tipos celulares diferentes: uno que expresa FSH β mRNA (A) y otro que expresa LH β mRNA (B).

Ambos tipos celulares se localizan en la Pars Distalis Proximal (PDP) pero con delimitaciones distintas. Las células que expresan FSH β se circunscriben a la parte externa de los cordones celulares de la PDP (A), mientras que las que expresan LH β son más numerosas y están situadas en la parte interna de estos cordones celulares, así como bordeando la PI (Pars Intermedia) (B). Barra, 400 μ m. Modificado de Muriach *et al.* (2008).



directa o indirectamente la liberación de gonadotrofinas como ciertos neuropéptidos (péptidos opiáceos, neuropéptido Y, colecistoquinina), aminas (dopamina, noradrenalina y serotonina) y aminoácidos neurotransmisores (GABA, taurina, ácido glutámico, ácido aspártico o la β -alanina) (Peter *et al.*, 1991; Kah *et al.*, 1993; Trudeau 1997; Yaron *et al.*, 2003). La regulación neuroendocrina de la síntesis y secreción de las gonadotrofinas se describe exhaustivamente y con detalle en el capítulo II de este mismo volumen (J.A. Muñoz-Cueto), por lo que no nos extenderemos más en ello.

La expresión génica y los niveles de ambas gonadotrofinas en la hipófisis y en el plasma de los teleósteos varían a lo largo del ciclo reproductor e incluso entre machos y hembras (Swanson *et al.*, 2003; Yaron *et al.*, 2003; Yaron y Sivan, 2006). Los estudios realizados en aquellas especies de teleósteos en las que ha sido posible cuantificar los niveles de ambas gonadotrofinas en plasma, muestran que la FSH está presente a lo largo de todo el ciclo, incrementando de forma notable durante la ovogénesis y espermatogénesis tempranas y durante la postovulación y postespermiogénesis, en hembras y machos, respectivamente. Por el contrario, los niveles de LH en plasma son bajos o indetectables durante las primeras fases de desarrollo gonadal y muestran un pico durante la fase de maduración final y ovulación en las hembras y espermiogénesis y espermiación en los machos (Swanson, 1991; Prat *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 1999). En los salmónidos los perfiles de expresión génica de ambas hormonas se correlacionan con sus niveles en plasma (Gómez *et al.*, 1999) y se ha visto que los niveles de ARN mensajero de FSH β incrementan antes que los de LH β . Sin embargo, en especies de peces no salmónidos con desarrollo gonadal asincrónico o de puestas múltiples como el pez rojo (Sohn *et al.*, 1999), la dorada japonesa (Gen *et al.*, 2000) o la lubina (Mateos *et al.*, 2003), no se observa este patrón diferencial de expresión de FSH y LH, a lo largo del ciclo reproductor, característico de salmónidos. En el pez rojo y en la lubina los niveles de expresión de las subunidades LH β y FSH β tienen perfiles similares y los niveles de LH en plasma son altos cuando se dan los máximos de maduración-ovulación y espermiogénesis-espermiación en las hembras y en los machos, respectivamente (Navas *et al.*, 1998; Sohn *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.* 2001; Mateos *et al.*,



2003). En la dorada japonesa se observa un claro dimorfismo sexual entre los patrones de expresión de la β FSH. En los machos la expresión aumenta con el desarrollo gonadal, pero no en las hembras. La β LH no presenta este dimorfismo y los niveles de expresión se mantienen altos en ambos sexos desde el inicio de la gametogénesis hasta la puesta (Gen *et al.*, 2000). Sin embargo, el pez espinoso a pesar de no ser un salmónido y tener un comportamiento reproductivo muy particular, presenta un perfil de expresión de las dos gonadotrofinas muy similar al observado en los salmónidos (Hellqvist *et al.*, 2006).

2.2.4. Acción fisiológica

Las gonadotrofinas regulan los procesos de gametogénesis y esteroidogénesis gonadal en todos los vertebrados. En tetrápodos está muy bien establecido el papel de cada gonadotrofina. A la FSH se le atribuye una acción estimuladora del desarrollo folicular temprano y la preparación de las gónadas para acciones posteriores de la LH, mientras que esta última estaría implicada en los procesos finales de maduración y ovulación/espermación. No obstante, en peces, existen pocos estudios donde se haya podido comparar directamente la actividad de la FSH y de la LH y establecer de forma clara su función diferencial. La mayor parte de la información, disponible al respecto, proviene de distintas especies de salmónidos en las que desde finales de los años 80 se han venido purificado ambas hormonas. En machos, durante el proceso de espermatogénesis, ambas gonadotrofinas estimulan la producción testicular de 11-cetotestosterona (11KT) *in vitro*, tanto en salmónidos (Planas y Swanson 1995) como en perciformes (Kagawa *et al.*, 1998). Estudios con la anguila japonesa sugieren que la 11KT, regulada por la FSH, es un factor endocrino clave para la iniciación de la proliferación espermatogonial (Ohta *et al.*, 2007). En la trucha, la FSH también estimula la proliferación de espermatogonias *in vitro* (Loir 1999). En el salmón, la potencia de la LH para estimular la producción de 11KT y 17α , 20β -dihidroxi-4-pregnen-3-one (DHP) aumenta a medida que avanza la espermatogénesis. Este aumento de la potencia esteroidogénica de la LH coincide con la aparición de células germinales post-meióticas y del receptor de LH en los testículos, con un incremento de los niveles de LH en plasma y con la espermación. En la lubina, se ha demostrado que los tratamientos con LH recombinante activan la esper-



miación y aumentan significativamente el volumen de espermatozoides respecto al grupo control (Mazón *et al.*, 2008). Ambas gonadotropinas estimulan, de forma similar, la producción *in vitro* de 17β -estradiol (E_2) en ovarios en vitelogenénesis de carpa común (Van Der Kraak *et al.*, 1992), atún (Okada *et al.*, 1994) y salmón (Suzuki *et al.*, 1988c, Planas *et al.*, 2000). Antes de la ovulación, coincidiendo con el cambio en la esteroideogénesis ovárica de E_2 a DHP y la rotura de la vesícula germinal, la potencia esteroidogénica de la LH excede enormemente a la de la FSH, (Suzuki *et al.*, 1988c; Planas *et al.*, 2000; Kagawa *et al.*, 1998, 2003). Actualmente parece estar claro que el proceso de vitelogenénesis está regulado por el E_2 (Nagahama *et al.*, 1993; Nagahama, 1994) y que la FSH estimula la conversión de T a E_2 , incrementando la actividad aromatasa y la expresión del gen P-450arom en el ovario (Montserrat *et al.*, 2004). Estudios en cultivos *in vitro* de gónadas de lubina, demostraron una alta actividad esteroidogénica de la FSH durante estadios iniciales de la maduración testicular y ovarios en vitelogenénesis (Moles *et al.*, 2008). Por lo tanto, todo esto sugiere que la FSH juega un papel fundamental en las fases iniciales de la espermatogénesis y vitelogenénesis. Esto contrasta con lo observado en la dorada japonesa, donde la LH es capaz de estimular la expresión y síntesis de P-450arom en oocitos vitelogénicos, mientras que la FSH es inefectiva (Kagawa *et al.*, 1998, 2003). Así pues, claramente la LH parece regular el final de la maduración oocitaria en todos los peces estudiados hasta el momento, mientras que los papeles relativos de la FSH y la LH en la regulación de la esteroidogénesis durante el crecimiento de los oocitos varían con las especies. La única función descrita hasta el momento exclusivamente para la FSH es su participación en la incorporación de vitelogenina en oocitos de trucha arcoiris (Tyler *et al.*, 1991).

2.2.5. Purificación, clonación y formas recombinantes de las gonadotropinas

Desde la década de los 80, se ha demostrado la existencia de dos gonadotropinas, químicamente diferentes, en numerosas especies de teleosteos. Debido a las pequeñas cantidades de GTHs presentes en la hipófisis, solo se han podido aislar y caracterizar bioquímicamente y fisiológicamente en un reducido número de especies. El proceso de purificación en muchos casos, supone una gran limitación al tener que sacrificar cientos o miles



de animales para obtener las hipófisis necesarias. Hasta la fecha se han aislado y caracterizado FSH y/o LH en 14 especies de teleósteos (Tabla 1). Tradicionalmente, los protocolos usados en la purificación de gonadotrofinas de peces han incluido una combinación de diferentes técnicas cromatográficas, principalmente gel filtración e intercambio iónico.

Por otra parte, gracias a las técnicas de biología molecular se han abierto nuevas perspectivas y se ha confirmado la dualidad de las gonadotrofinas de numerosas especies de peces al clonar las secuencias codificantes de sus tres subunidades (Tabla 2). La clonación de las subunidades gonadotropas ha permitido comparar las secuencias de nucleótidos y de aas en diversos vertebrados, demostrando que la GTH

TABLA 1.

Especies de teleósteos en las cuales se han purificado las gonadotrofinas y/o sus subunidades.

Especie	Nombre común	Gonadotrofina	Peso molecular	Referencia
<i>Oncorhynchus keta</i>	Salmón chum	GP α , FSH β y LH β FSH y LH	22, 17 y 18 Kda 50 y 36 KDa	Suzuki <i>et al.</i> , 1988a,b
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Salmón coho	GP α , FSH β y LH β FSH y LH	20-24, 19 y 22 Kda 43 y 39 KDa	Swanson <i>et al.</i> , 1991
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa común	FSH y LH	45 y 35 KDa	Van Der Kraak <i>et al.</i> , 1992
<i>Katsuwonus pelamis</i>	Bonito	FSH y LH	39 y 30 KDa	Koide <i>et al.</i> , 1993
<i>Pagrus major</i>	Dorada japonesa	FSH y LH	32 y 38 KDa	Tanaka <i>et al.</i> , 1993
<i>Micropogonias undulatus</i>	Corbina	GP α , FSH β y LH β FSH y LH	17, 19 y 20.5 KDa	Copeland y Thomas, 1993
<i>Thunnus obesus</i>	Patudo	FSH y LH	40.5 y 27 KDa	Okada <i>et al.</i> , 1994
<i>Seriola dumerilii</i>	Pez limón	GP α , FSH β y LH β FSH y LH	17, 28 y 21.5 KDa 47 y 29 KDa	García-Hernández <i>et al.</i> , 1997
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoiris	FSH y LH	45 y 35 KDa	Govoroun <i>et al.</i> , 1997 Santos <i>et al.</i> , 2001
<i>Morone saxatilis</i>	Lubina estriada	GP α , LH β y LH	14.8, 20.4 y 34.5 KDa	Mañanós <i>et al.</i> , 1997
<i>Fundulus heteroclitus</i>	Fúndulo	GP α , FSH β y LH β FSH y LH	22-23, 18 y 21 KDa	Shimizu y Yamashita, 2002
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Fletán	GP α , FSH β y LH β FSH y LH	19, 25 y 24 KDa 33 y 32 KDa	Weltzien <i>et al.</i> , 2003
<i>Anguilla japonica</i>	Anguila japonesa	GP α , FSH β y FSH	19, 17-21 y 33 KDa	Kamei <i>et al.</i> , 2005
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Lubina	GP α , LH β y LH	12, 22 y 31 KDa	Mateos <i>et al.</i> , 2006
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Lubina	GP α , FSH β y LH β FSH	12.6, 13.6 y 15.3 KDa 28.5 KDa	Molés <i>et al.</i> , 2008



TABLA 2.
Clonación de los cDNAs de las subunidades gonadotropas en peces.

Grupo taxonómico / Especie	Nombre común	Subunidad	Referencia
Chondrichthyes			
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Melgacho	FSH β , LH β	Quérat <i>et al.</i> , 2001
Chondrostei			
<i>Acipenser baeri</i>	Esturión	FSH β , LH β	Quérat <i>et al.</i> , 2000
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	Esturión ruso	GP α , FSH β , LH β	Hurvitz <i>et al.</i> , 2005
Anguilliformes			
<i>Anguilla anguilla</i>	Anguila	GP α , LH β FSH β	Quérat <i>et al.</i> , 1990a,b Degani <i>et al.</i> , 2003
<i>Anguilla japonica</i>	Anguila japonesa	FSH β , LH β	Yoshiura <i>et al.</i> , 1999
<i>Conger myriaster</i>	Congrio	FSH β , LH β	Kajimura <i>et al.</i> , 2001b
Salmoniformes			
<i>Oncorhynchus keta</i>	Salmón chum	FSH β , LH β	Sekine <i>et al.</i> , 1989
<i>Oncorhynchus masou</i>	Salmón japonés	FSH β , LH β	Kato <i>et al.</i> , 1993
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoiris	FSH β , LH β	#AB050835 #AB050836
Cypriniformes			
<i>Carassius auratus</i>	Pez rojo	FSH β , LH β	Yoshiura <i>et al.</i> , 1997
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa común	GP α , LH β FSH β	Chang <i>et al.</i> , 1988 #AB003583
<i>Mylopharyngodon piceus</i>	Caracolera	FSH β , LH β	Elizur <i>et al.</i> , 2000
Siluriformes			
<i>Ictalurus punctatus</i>	Azul	FSH β , LH β	Liu <i>et al.</i> , 2001
<i>Clarias gariepinus</i>	Pez gato	FSH β	Vischer <i>et al.</i> , 2003
Cyprinodontiformes			
<i>Fundulus heteroclitus</i>	Fúndulo	FSH β , LH β	Lin <i>et al.</i> , 1992
Perciformes			
<i>Morone saxatilis</i>	Lubina estriada	GP α , FSH β , LH β	Hassin <i>et al.</i> , 1995
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Lubina	GP α , FSH β , LH β	Mateos <i>et al.</i> , 2003
<i>Sparus aurata</i>	Dorada	FSH β , LH β	Elizur <i>et al.</i> , 1996
<i>Oreochromis niloticus</i> x <i>O. aureus</i>	Tilapia híbrida	LH β	Rosenfeld <i>et al.</i> , 1997
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Tilapia mosámbica	GP α , FSH β	Rosenfeld <i>et al.</i> , 1997 Gur <i>et al.</i> , 2001
<i>Trichogaster trichopterus</i>	Blue gourami	FSH β , LH β	Jackson <i>et al.</i> , 1999
<i>Pagrus major</i>	Dorada japonesa	FSH β , LH β	Gen <i>et al.</i> , 1993
<i>Acanthopagrus latus</i>	Sargo aleta amarilla	LH β	Tsai y Yang, 1995
<i>Katsuwonus pelamis</i>	Barrilete listado	FSH β , LH β	Koide <i>et al.</i> , 1993
<i>Micropogonias undulatus</i>	Corbina	FSH β , LH β	Banerjee y Khan, 2008
<i>Channa maculata</i>	Snakehead	FSH β , LH β	Chatterjee <i>et al.</i> , 2005
Scorpaeniformes			
<i>Sebastes schlegelii</i>	Korean rockfish	GP α , FSH β , LH β	Kim <i>et al.</i> , 2005
Gasterosteiformes			
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Espinoso	FSH β , LH β	Hellqvist <i>et al.</i> , 2004
Pleuronectiformes			
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Falso halibut del Japon	FSH β , LH β	Kajimura <i>et al.</i> , 2001a
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Fletán	GP α , FSH β , LH β	Weltzien <i>et al.</i> , 2003

Ampliado de Yaron *et al.*, 2003.



I y GTH II de peces son homologas a la FSH y LH de tetrápodos (Quérat *et al.*, 2000). Además, la clonación de estas secuencias ha supuesto un gran avance en el estudio del proceso reproductor de los teleósteos, permitiendo caracterizar estos genes y desarrollar herramientas moleculares para estudiar los perfiles temporales de expresión a lo largo del ciclo reproductor. La información disponible sobre la estructura de los genes de las subunidades gonadotropas está limitada a unas cuantas especies de vertebrados superiores y en general presentan una organización genómica bastante bien conservada. Así, todos los genes $GP\alpha$, aislados hasta el momento, constan de 4 exones separados por 3 intrones de tamaño variable, mientras que los genes de las subunidades β (FSH y LH) contienen 3 exones y 2 intrones (Fig.3) (Bousfield *et al.*, 1994).

Por otra parte, la clonación de los cDNAs de las tres subunidades de las gonadotropinas ha abierto la posibilidad de usar técnicas de DNA recombinante para producir FSH y LH. En líneas generales, esta meto-

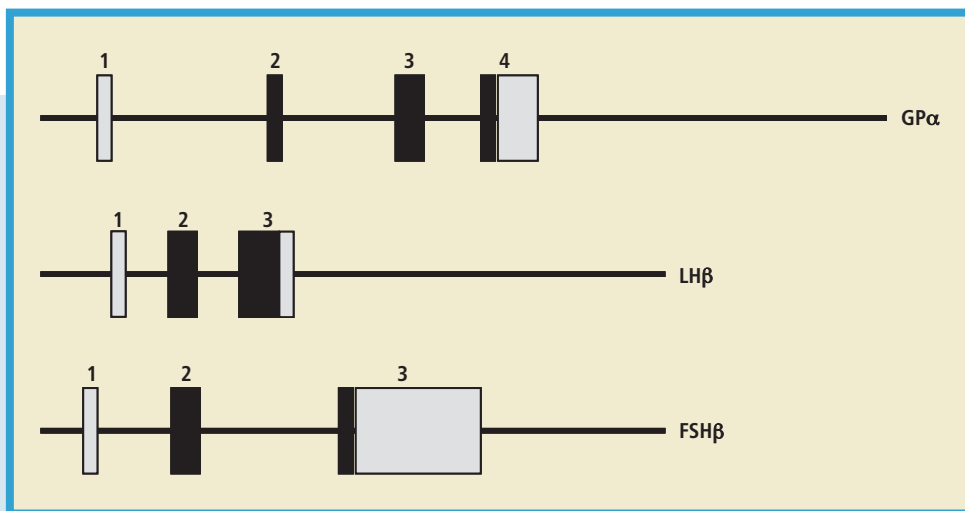


FIGURA 3.

Representación esquemática de los genes alfa y beta de las gonadotropinas.

Las cajas representan los exones correspondientes a cada subunidad.

En gris se indican las zonas no traducidas, mientras que en negro se muestran las secuencias codificantes.



dología consiste en insertar las secuencias codificantes de los genes de interés (cDNA) en vectores de expresión (plásmidos o virus) para transformar o transfectar cultivos celulares u organismos heterólogos, donde, normalmente bajo el control de promotores fuertes, se expresan en grandes cantidades. Esta metodología supone otro avance importante en el estudio de la reproducción en peces teleósteos, puesto que permite el suministro de gonadotrofinas de forma continua eliminando la necesidad de sacrificar un número elevado de peces para purificarlas. Por otra parte, estas herramientas abren la posibilidad de generar formas alteradas de las mismas proteínas con el objetivo de mejorar o potenciar su actividad. Así, la producción de gonadotrofinas recombinantes es una atractiva alternativa para disponer de FSH y LH y así poder estudiar su función. Para la producción de proteínas recombinantes se han usado diferentes sistemas de expresión, tanto procariotas como eucariotas. Los sistemas procariotas tienen la ventaja de su fácil manejo, pero presentan el inconveniente de carecer de los orgánulos o elementos celulares necesarios para procesar correctamente proteínas complejas como las gonadotrofinas. Los sistemas eucariotas, por el contrario, poseen la maquinaria celular adecuada para realizar las modificaciones post-traduccionales requeridas para una biosíntesis correcta que asegure la completa bioactividad de estas glicoproteínas. Desde que se empezó a usar esta tecnología, se han producido varias GTHs recombinantes de varias especies de peces, tanto subunidades aisladas como dímeros, e incluso en algunos casos recombinantes de cadena única donde ambas subunidades están fusionadas. Todas estas formas recombinantes han sido usadas en el estudio de su endocrinología reproductiva (Tabla 3). Todos los sistemas de expresión eucariotas (ameba, levadura, células de insecto y de mamífero) han dado lugar a gonadotrofinas de peces biológicamente activas. Las cantidades producidas varían de unos sistemas a otros, y en general suelen ser suficientes para realizar estudios fisiológicos *in vitro*, pero no para tratamientos a gran escala en cultivos de peces. Debido a las grandes cantidades de hormona que serían necesarias para este último uso, se han planteado otros sistemas de producción como es el uso de organismos enteros en lugar de cultivos celulares. En estos se puede obtener mayor cantidad de proteína recombinante a menor coste. Así, en peces se ha



TABLA 3.

Producción de gonadotrofinas recombinantes en diferentes sistemas de expresión.

Especie	Nombre común	Sistema expresión	Línea celular/organismo	Gonadotrofina	Referencia
<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Salmón	Bacterias	<i>Escherichia coli</i>	LH	Hew <i>et al.</i> , 1989
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa común	Baculovirus	Sf9	GP α	Huang <i>et al.</i> , 1991
<i>Sparus aurata</i>	Dorada	Baculovirus	Sf9	FSH y LH	Meiri <i>et al.</i> , 1999
<i>Morone saxatilis</i>	Lubina estriada	Células mamíferos	CHO	FSH y LH	Blaise <i>et al.</i> , 1999
<i>Clarias gariepinus</i>	Pez gato	Amebas	<i>Dictyostelium discoideum</i>	FSH y LH	Vischer <i>et al.</i> , 2003
<i>Ictalurus punctatus</i>	Azul	Baculovirus	Sf9	FSH y LH	Zmora <i>et al.</i> , 2003
<i>Carassius auratus</i>	Pez rojo	Baculovirus	<i>Bombyx mori</i>	FSH y LH	Kobayashi <i>et al.</i> , 2003 Kobayashi <i>et al.</i> , 2006
<i>Anguilla japonica</i>	Anguila japonesa	Levaduras	<i>Pichia pastoris</i>	scFSH	Kamei <i>et al.</i> , 2003
<i>Carassius auratus</i>	Pez rojo	Transgénicos	Embriones trucha arcoiris	scFSH y scLH	Morita <i>et al.</i> , 2003 Morita <i>et al.</i> , 2004
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia	Levaduras	<i>Pichia pastoris</i>	scFSH y scLH	Kasuto y Levavi-Sivan, 2005 Aizen <i>et al.</i> , 2007
<i>Danio rerio</i>	Pez cebra	Células mamíferos	CHO	scFSH y scLH	So <i>et al.</i> , 2005
<i>Brachymystax lenok</i>	Trucha de Manchuria	Células mamíferos	CHO	scFSH y scLH	Choi <i>et al.</i> , 2005
<i>Epinephelus coioides</i>	Mero	Baculovirus	Sf9	LH	Cui <i>et al.</i> , 2007
<i>Brachymystax lenok</i>	Trucha de Manchuria	Baculovirus	<i>Bombyx mori</i>	scFSH y scLH	Ko <i>et al.</i> , 2007
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Lubina	Baculovirus	Sf9	FSH y LH	Molés <i>et al.</i> , no publicado
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Lubina	Células mamíferos	CHO	FSH, scFSH y scLH	Molés <i>et al.</i> , no publicado Gómez <i>et al.</i> , no publicado

Sc, hormona recombinante de cadena única.

descrito la producción de FSH y LH recombinantes de pez rojo (*Carassius auratus*) y trucha de Manchuria (*Brachymystax lenok*) en larvas de gusano de seda (*Bombyx mori*) mediante infecciones con baculovirus portadores de los genes de interés (Kobayashi *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2007). De esta manera, las larvas producen las proteínas de interés en todas aquellas células de su organismo que han sido infectadas.

2.2.6. Métodos o sistemas de cuantificación de GTHs

En la actualidad existen varios sistemas para cuantificar las gonadotrofinas. Esta variedad de metodologías permite obtener información importante acerca de su función y estructura (p.e., respuesta biológica ante la estimulación con FSH o LH, estimación de la capacidad de



unión a sus receptores, determinación de características estructurales y/o propiedades moleculares, etc.). Entre estos sistemas de medición se pueden destacar los bioensayos, inmunoensayos, ensayos con lectinas y ensayos con receptores específicos.

Bioensayos in vivo

Estos ensayos se basan en los efectos que producen extractos más o menos puros de GTHs en las gónadas del animal tratado. El mayor inconveniente de este ensayo es que puede desestimar el efecto biológico de formas de FSH o LH de vida media corta. Estudios realizados en humanos indican que este tipo de ensayo no detecta la acción biológica de isoformas de FSH con puntos isoeléctricos mayores de 5. Esto puede ser importante a la hora de calibrar formas recombinantes y en la asignación de actividades específicas relacionadas con el contenido de proteína.

Bioensayos in vitro

Los bioensayos *in vitro* están basados, en gran parte, en respuestas celulares cuantificables a la estimulación con GTHs. Entre estas respuestas se incluye la producción de AMPcíclico (cAMP), actividad aromataasa, o producción del activador de plasminógeno por cultivos de células de Sertoli o células de la granulosa. Estos bioensayos proporcionan métodos muy sensitivos de estimación de la actividad biológica de preparaciones más o menos puras de FSH y LH. El principal inconveniente de estos sistemas es que no se puede evaluar la vida media de las diferentes isoformas empleadas. Por lo tanto el diseño adoptado en muchos bioensayos *in vitro* puede dar lugar a resultados parciales. Sin embargo, han demostrado ser herramientas muy valiosas a la hora de esclarecer la fisiología de las gonadotrofinas.

Inmunoensayos

Los inmunoensayos se usan para determinar las fluctuaciones estacionales de los niveles circulantes de FSH y LH en estudios fisiológicos, debido a que son ensayos rápidos, fácilmente disponibles, relativamente baratos y sensitivos. Generalmente se consideran más precisos que los bioensayos *in vivo* aunque no dan información sobre



la actividad biológica. Los primeros inmunoensayos para GTHs estuvieron basados en el formato RIA (Radioinmunoensayo) y actualmente todavía siguen en uso. Sin embargo, los RIAs han sido en gran parte sustituidos por ensayos basados en anticuerpos monoclonales. La mayoría de los ensayos disponibles ahora están basados en sándwiches de anticuerpos monoclonales o monoclonal-policlonales con una gran variedad de modos de detección. Este tipo de ensayos (ELISA, EIA, etc.) en general, son más sensitivos y precisos. Los últimos inmunoensayos desarrollados son altamente específicos y pueden excluir algunas isoformas de interés. Por ello, en ocasiones, es preferible un ensayo basado en anticuerpos policlonales específicos que pueden detectar los diferentes isotipos de la hormona en cuestión. A pesar de las ventajas que ofrecen los inmunoensayos respecto a otros sistemas de medición, todavía hay una considerable variabilidad entre los resultados de diferentes ensayos para gonadotrofinas. Las razones de tales variaciones se han atribuido a diferencias en la calibración, actividad cruzada entre subunidades gonadotropas, falta de linealidad entre estándares disponibles y variación de las características dosis-respuesta entre ensayos.

Ensayos con lectinas

Están basados en la capacidad de un grupo de proteínas, las lectinas, para unirse de forma específica y reversible a los hidratos de carbono, ya estén libres o formando parte de estructuras más complejas. La sustitución del anticuerpo detector en un formato ELISA por lectinas marcadas da lugar a ensayos que pueden detectar cambios en las estructuras de los oligosacáridos. Esta metodología generalmente no es cuantitativa pero se ha usado para sondear diferencias cualitativas entre diferentes preparaciones de GTHs. Por otro lado, la cromatografía de afinidad con lectinas, en las que se aplican muestras de suero y se eluyen las gonadotrofinas con concentraciones crecientes del azúcar adecuado, resulta muy útil para identificar distintas isoformas de FSH o LH, aquellas isoformas que no se unen a la columna, las que lo hacen débilmente y las que se unen fuertemente, en función de su composición glicosídica. De esta manera se pueden detectar diferencias brutas en la composición de azúcares de las gonadotrofinas.



Ensayos con receptores específicos

Estos ensayos consisten en la estimación de la unión de muestras desconocidas a receptores específicos. Los primeros ensayos con receptores se basaron en el uso de preparaciones solubilizadas de membranas de testículo de ternero. Estos ensayos son muy robustos y todavía se usan, con algunas modificaciones, para cuantificar gonadotrofinas en el suero sanguíneo. Variantes del ensayo utilizan líneas celulares transfectadas con receptores recombinantes. Los resultados obtenidos en ensayos con receptores son bastante consistentes en comparación con los ensayos *in vitro*.

Una combinación de receptor y anticuerpo en un formato tipo ELISA podría dar lugar a un ensayo útil y práctico que estimaría tanto características funcionales como estructurales inmunológicamente reactivas. (Rose *et al.*, 2000).

2.3. LOS RECEPTORES DE LAS GONADOTROFINAS

Las GTHs ejercen su acción uniéndose a receptores de membrana específicos localizados en la superficie de las células diana. En los vertebrados superiores se han descrito dos tipos de receptores específicos para las gonadotrofinas uno que liga la FSH (FSHR) y otro que liga la LH (LHR). En los primates y equinos, el LHR también une la gonadotrofina coriónica (CG), una hormona placentaria, estructuralmente similar a la LH (Bousfield *et al.*, 1994).

Los primeros estudios relativos a los receptores de gonadotrofinas en peces (GTHRs) no dejaban clara su dualidad (Bieniarz y Kime, 1986; Breton *et al.*, 1986; Kanamori *et al.*, 1987; Kanamori y Nagahama, 1988). Los estudios de Yan *et al.* (1992) en el salmón plateado (*Oncorhynchus kisutch*) demostraron claramente, por primera vez, que en los ovarios de los peces teleósteos existían dos tipos de GTHRs, el tipo I y el tipo II. Posteriormente Miwa *et al.* (1994) localizaron ambos tipos de receptores en ovarios y testículos de salmón plateado en varios estados de recrudescencia gonadal. Al mismo tiempo Quesnel y Breton (1993) identificaron un receptor para la LH en el ovario de la trucha común



(*Salmo trutta trutta*). El tipo I (FSHR) interactuaba con ambas GTHs pero con mayor afinidad por la FSH y el tipo II (LHR) se unía específicamente a la LH (Yan *et al.*, 1992). Desde que se estableció la dualidad de los GTHRs en los peces, el esfuerzo dedicado a su caracterización ha sido razonable, pero bastante menor que el dedicado a sus ligandos, lo que ha dificultado la comprensión de las acciones biológicas de las GTHs en los peces. A continuación, se revisa la información disponible en lo que respecta la estructura, expresión y función de los GTHRs de los peces.

2.3.1. Clonación de los receptores de las gonadotrofinas

En 1989, de forma simultánea, McFarland *et al.* y Loosfelt *et al.*, aislaron por primera vez el cDNA del LHR de rata y de cerdo, respectivamente. La disponibilidad de la secuencia de estos cDNAs permitió deducir los cDNAs homólogos en numerosas especies de mamíferos. En peces, Dittman *et al.* (1995) aislaron, por primera vez en el salmón plateado, un cDNA que presentaba funciones de LHR pero estructura de TSHR y en 1999 Bogerd *et al.* lo hicieron con un receptor de hormonas glicoproteicas (GPHR) de identidad dudosa en el pez gato (*Clarias gariepinus*). Posteriormente y por primera vez en los teleósteos, Oba *et al.*, (1999ab) lograron aislar y caracterizar funcionalmente, en ovario y testículo del salmón «amago» (*Oncorhynchus rhodurus*), las secuencias completas de los cDNA que codifican tanto el LHR como el FSHR, demostrando definitivamente la dualidad de los GTHRs al menos en los salmónidos. En la actualidad, mediante clonación de los respectivos cDNAs codificantes, también se ha demostrado la existencia de estos dos tipos de receptores en Perciformes: la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Oba *et al.*, 2001), la dorada Europea (*Sparus aurata*) (Wong *et al.*, 2004) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Rocha *et al.*, 2007); en Siluriformes: el pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Kumar *et al.*, 2001a, b) y el pez gato Africano (*Clarias gariepinus*) (Bogerd *et al.*, 2001; Vischer y Bogerd, 2003); en Cipriniformes: el pez cebra (*Danio rerio*) (Laan *et al.*, 2002; Kwok *et al.*, 2005) y en otras especies de Salmoniformes: el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Maugars y Schmitz, 2006) y la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Sambroni *et al.*, 2007).



2.3.2. Principales atributos de los receptores de las gonadotrofinas deducidos a partir de sus secuencias de cDNA

Los GTHRs, FSHR y LHR, junto con el receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSHR), constituyen la familia de los receptores de las hormonas glicoproteicas, una subclase de la gran superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que actúan como transductores de señales a través de la membrana celular (Vassart *et al.*, 2004). Los GPHRs están constituidos por una sola cadena proteica en la que se pueden identificar tres dominios: un largo dominio N-terminal expuesto en la cara extracelular de la membrana, una región de plegamiento con siete hélices α transmembranales (7TM) conectadas por tres asas intracelulares y tres asas extracelulares y un dominio intracelular C-terminal (Fig. 4). Una de las principales características de los GPHRs es su dominio extracelular que constituye más de la mitad de la totalidad de la proteína y contribuye al reconocimiento y a la especificidad de unión de la hormona al receptor (Dias *et al.*, 2002; Ascoli *et al.*, 2002).

El análisis de las secuencias de aas de los dominios extracelulares de los GPHRs muestra una porción central compuesta por nueve repeticiones ricas en leucinas (LRR), flanqueadas por regiones ricas en cisteínas que protegen del solvente al núcleo hidrofóbico de las LRR. La región C-terminal, rica en cisteínas, es a veces denominada como región bisagra o como dominio de especificidad de la señalización. Se ha visto que esta región tiene un papel muy importante en el reconocimiento específico de la hormona por su receptor y en la transducción de la señal (Vassart *et al.*, 2004). Los motivos LRR se han descrito en un gran número de proteínas y comprenden aproximadamente 20-24 residuos de aas, formados por unidades estructurales hoja β corta/hélice α conectadas entre sí por un giro β . Todas las hojas β y hélices α son paralelas a un eje común dando como resultado una molécula, con una curvatura en forma de herradura de caballo, en cuyo interior se alinean las hojas β (Kobe y Kajava, 2001). En base a la estructura de proteínas con motivos LRR, se han creado modelos de los dominios extracelulares de los receptores de la LH y TSH (Kajava *et al.*, 1995;

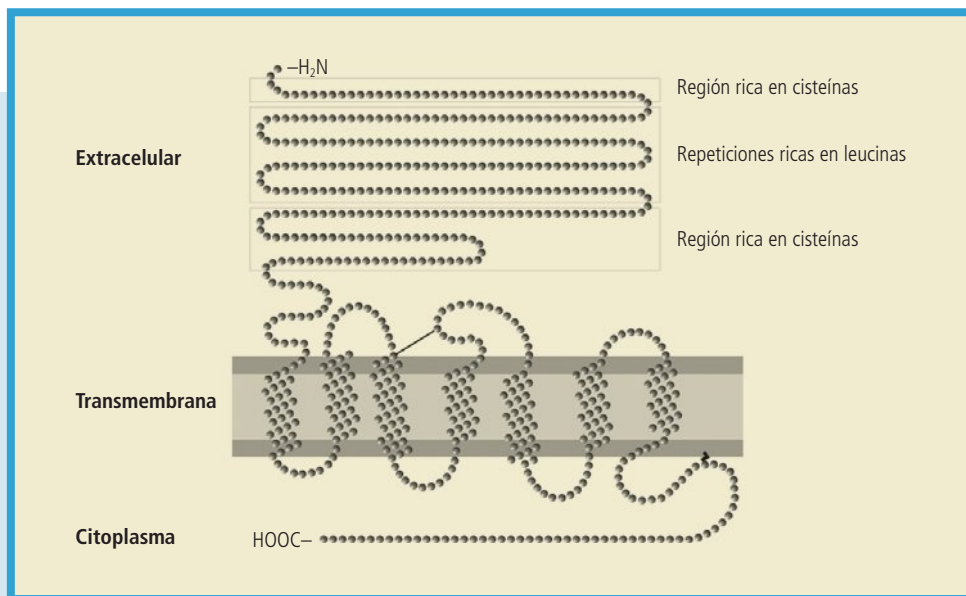


FIGURA 4.

Representación esquemática de la estructura generalizada de los GTHRs, ilustrando el dominio extracelular N-terminal, las siete hélices transmembrana y la cola intracelular C-terminal. El dominio extracelular comprende repeticiones ricas en leucinas flanqueadas por regiones ricas en cisteínas. La línea negra representa un puente disulfuro formado por dos residuos de cisteína, sumamente conservados, presentes en las alas extracelulares uno y dos del dominio transmembrana. La capa bilipídica de la membrana celular está representada por dos barras grises. El extremo C-terminal de la octava hélice transmembrana posee una cisteína conservada, potencialmente implicada en palmitoilación, anclando esta parte de la cola intracelular a la membrana plasmática (indicado por una barra en zigzag). Adaptado de Vassart *et al.* (2004).

Jiang *et al.*, 1995; Bhowmick *et al.*, 1996). A partir de ellos se ha predicho que la unión de la LH y TSH a sus respectivos receptores, implica múltiples puntos de contacto con la región cóncava de sus dominios extracelulares. La reciente publicación de la estructura cristalina de la FSH humana (hFSH), unida al dominio extracelular (aas 1-268) del FSHR humano (hFSHR) (Fan y Hendrikson, 2005), ha permitido corregir y perfeccionar los modelos existentes. Sus principales atributos son la existencia de nueve hojas β paralelas que forman una molécula con



una curvatura menos pronunciada de lo esperado y la presencia de una décima hoja β en la región N-terminal rica en cisteínas.

Las secuencias de cDNA de los GTHRs de peces, conocidas hasta el presente, codifican proteínas que oscilan entre 658 y 704 aas en los FSHRs y 693 y 728 aas en los LHRs. Los primeros 16 a 20 aas corresponden al péptido señal, ausente en la proteína madura. Al igual que en los mamíferos (Dias *et al.*, 2002; Ascoli *et al.*, 2002), aves (You *et al.*, 1996; Mizutani *et al.*, 1998), reptiles (Borrelli *et al.*, 2001; Bluhm *et al.*, 2004) y anfibios (Nakayama *et al.*, 2000), los GTHRs de los peces pertenecen a la superfamilia de los GPCRs. La estructura primaria de estos receptores, es decir las secuencias de aas deducidas a partir de sus cDNAs, muestran las características típicas de los GPHRs: un largo dominio extracelular compuesto por series de repeticiones ricas en leucinas (LRR) flanqueadas por regiones ricas en cisteínas a ambos lados proximal y distal, un dominio TM y un dominio intracelular C-terminal. El porcentaje de identidad entre las secuencias completas de aas de los FSHR de las diferentes especies de peces es aproximadamente del 71,5%. Respecto al LHR, el porcentaje de identidad esta alrededor del 68%. Estos valores aumentan cuando comparamos las secuencias de los GTHRs de peces pertenecientes al mismo orden. El dominio TM presenta una similitud más elevada mientras que el dominio con mayor variabilidad es la cola intracelular.

Pese a que existe una elevada similitud estructural entre los GTHRs de los peces y sus homólogos en mamíferos, se pueden observar diferencias importantes sobre todo en los FSHRs. Contrariamente a lo observado en el FSHR y LHR de mamíferos y en otras proteínas con dominios LRR, el FSHR de salmón no presenta una región rica en cisteínas bordeando el extremo N-terminal del dominio LRR (Oba *et al.*, 1999 ab; Maugars y Schmitz, 2006; Sambroni *et al.*, 2007) (Fig. 5.). En los salmónidos, esta región solo tiene un residuo de cisteína que se alinea con la última cisteína del grupo de cisteínas N-terminal de los GPHRs de los mamíferos. En los mamíferos esta región posee cuatro residuos de cisteínas (Vassart *et al.*, 2004), en las aves tres (You *et al.*, 1996; Mizutani *et al.*, 1998) y en los teleósteos dos o uno. Además, los FSHRs de los perciformes (tilapia, dorada y lubina), tienen una inserción de nueve aas en esta región, concretamente donde se encuentra uno de los dos residuos de cisteína



(Fig.5). Se ha demostrado, por cristalografía, que las cuatro cisteínas del grupo N-terminal del FSHR humano forman dos puentes disulfuro entre si y se piensa que este grupo es preciso para el plegamiento correcto de la proteína (Fan y Hendrickson, 2005). Considerando las diferencias existentes, tanto en la distribución espacial como en el número de los residuos de cisteínas, entre los FSHRs humano y de peces se supone que el plegamiento de las cadenas polipeptídicas de los FSHRs de peces puede ser distinto al descrito para el hFSHR. En el dominio extracelular de los LHRs de peces, se pueden identificar nueve motivos LRR, ubicados en las posiciones correspondientes a los nueve LRR descritos para los LHRs de mamíferos. En el dominio extracelular de los FSHRs de gran parte de las



FIGURA 5.

Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de FSHRs mostrando la región N-terminal rica en cisteínas y parte de la región LRR del dominio extracelular. Números de acceso del GenBank: humano (Hum) AY429104, lubina (Sbs) AY642113, tilapia del Nilo (Til) AB041762, dorada (Sb) AY587262, salmón «amago» (As) AB030012, salmón Atlántico (Ats) AJ567667, trucha arco-iris (Rtr) AF439405, pez cebra (Zbf) AY278107, pez gato Africano (Ac) AJ012647, pez gato (Cc) AF285182. Los números a la derecha se refieren a la posición de los aminoácidos en la proteína. La secuencia del sbsFSHR está destacada en negrita. Aquellos residuos conservados en todas las secuencias se encuentran en un recuadro gris. Las barras negras encima de la secuencia indican el motivo (X-L-X-L-X) de la hoja β de las LRRs. Se indica la posición de los intrones amplificadas en esta región del *FSHR* de lubina.



especies de peces, al igual que ocurre en los LHRs, se pueden identificar nueve motivos LRR que corresponden a repeticiones descritas en el hFSHR (Fan y Hendrickson, 2005). No obstante, los FSHRs de los peciformes poseen una LRR adicional codificada por una inserción de 25 aas (Fig. 5). En este grupo de peces la presencia de esta LRR extranumeraria podría indicar que en este receptor el dominio de unión al ligando, a pesar de presentar una misma configuración, tiene un tamaño y curvatura distintos a los descritos para el hFSHR y ello podría afectar a la unión de la hormona.

Los dominios TM de los GPHRs de peces están extremadamente conservados. En ellos se pueden identificar varios motivos típicos de los GPCRs implicados en la activación del receptor. La primera y segunda asas extracelulares incluyen dos cisteínas que virtualmente forman un enlace intramolecular por puente disulfuro que sujeta la proteína (Gudermann *et al.* 1995).

Los dominios intracelulares de los GPHRs de peces, al igual que los demás GPCRs, son ricos en serinas, treoninas y tirosinas que son aas potenciales de sitios de fosforilación. Esto es importante ya que los procesos de fosforilación del dominio intracelular constituyen un mecanismo de regulación, a corto plazo, del número de receptores presentes en la membrana celular. Además, el dominio intracelular de los LHRs de peces posee dos cisteínas adyacentes muy conservadas que potencialmente podrían estar implicadas en palmitoilación y acoplamiento a la membrana como ocurre en el LHR de rata (Kawate y Menon, 1994).

Glicosilación de los receptores de las gonadotrofinas

En el dominio extracelular de los GPHRs de peces existen varios sitios potenciales de N-glicosilación que no están estrictamente conservados, aunque uno de ellos (¹⁹¹NGT en el FSHR humano), se ha conservado en el FSHR, LHR e incluso en el TSHR. La glicosilación del receptor no es importante para la vida media de la proteína en circulación, dado que esta no es secretada como ocurre con las GTHs. Se ha sugerido que el grado de glicosilación de los GPHRs podría afectar a la unión de la hormona, aunque los estudios mas recientes indican que en la interfaz de unión hormona-receptor no hay carbohidratos (Fan y Hendrickson,



2005). Seguramente la glicosilación estaría relacionada con la estabilidad y con el plegamiento adecuado de la proteína (Davis *et al.* 1995; Davis *et al.* 1997).

2.3.3. Estructura y organización de los genes de los receptores de las gonadotrofinas

Los genes de los GTHRs de mamíferos son genes de copia única y comparten una elevada similitud estructural. Los genes del FSHR están constituidos por diez exones y nueve intrones mientras que los genes del LHR tienen once exones (Atger *et al.*, 1995; Gromoll *et al.*, 1996). El exón adicional que presentan los LHRs respecto a los FSHRs está insertado entre el exón nueve y diez. Los exones 2-8, que codifican LRRs, tienen tamaños y secuencias muy similares. Cada uno de estos exones está interrumpido por un intrón en una posición homóloga de cada motivo LRR. En comparación con cada uno de los exones 2-8, el exón 9 les duplica en tamaño y codifica dos LRRs consecutivas. El último exón de cada gen de estos receptores codifica una pequeña fracción del dominio extracelular y la totalidad de los dominios transmembrana e intracelular. En peces, solo se conoce la organización estructural completa del gen del LHR en la lubina (A Rocha, S Zanuy, M Carrillo, A Gómez, *por publicar*). El número y distribución de sus exones, es homóloga a la descrita en los mamíferos. Sin embargo, el análisis parcial de la estructura del gen de FSHR de la misma especie, demostró la presencia de tres intrones en su dominio TM (A Rocha, S Zanuy, M Carrillo, A Gómez, *por publicar*). En la tilapia y en el salmón amago también se ha descrito presencia de intrones en la región codificadora de la TM. En genes homólogos de invertebrados se ha visto una organización similar en la localización de los intrones descritos en los genes del salmón, tilapia y lubina. Por lo tanto, los peces representan una etapa de transición en la pérdida de intrones en la región que codifica los dominios TM e intracelular. Finalmente, este análisis de la estructura primaria del FSHR de lubina mostró la presencia de un motivo LRR adicional, codificado por una inserción de 25 aas, en el dominio extracelular. Según la organización estructural de los genes de FSHR de rata y humano, cada motivo LRR interno corresponde a un intrón. Esta organización estructural se ha preservado en el FSHR la lubina ya que en su dominio extracelular



se ha identificado un intrón extra, justo en la secuencia que codifica la inserción de 25 aas. Al comparar los genes del FSHR de lubina y humano, se puede identificar fácilmente la presencia de un exón extra de 75 pb (pares de bases) en el gen de la lubina. Dados la fase y posición de los intrones amplificados y en base al modelo de evolución propuesto para proteínas constituidas por motivos LRR (Fedorov *et al.*, 1998; Haigis *et al.*, 2002), se cree que la presencia de este exón extra es el resultado de la duplicación de un exón interno. Así mismo, teniendo en cuenta que este exón extra no existe en los FSHRs de los salmones, pez cebra y pez gato, esta duplicación habría ocurrido después de la diversificación de los Euteleostei, en los tres superórdenes Ostariophysi, Protacanthopterygii y Acanthopterygii, pero antes de la divergencia de los linajes de los Perciformes, Beloniformes y Tetraodontiformes, ya que este exón extra también existe en los FSHRs del fugu rubripes y medaka (Ensembl release 42; *Takifugu rubripes* scaffold_7634 and *Oryzias latipes* chromosome 19 11454591:11468192).

2.3.4. Interacción hormona-receptor

Unión del ligando

Desde principios de la década de los 90 se cree que las LRRs, presentes en el dominio extracelular de los GTHRs, son las estructuras implicadas en la especificidad de la unión del ligando al receptor. Sin embargo, el mecanismo de unión de la hormona y consecuentemente el modo de activación del receptor, no estuvo claro hasta que se publicó la estructura cristalina de la hFSH unida al dominio extracelular (aas 1-268) del hFSHR (Fan y Hendrickson, 2005). Según este estudio, la totalidad de las 10 hojas β , que forman el dominio LRR del hFSHR, está implicadas en las interacciones hormona-receptor. Las hojas β del receptor interactúan con los segmentos C-terminal de ambas subunidades FSH α y β y también con sus lazos α L2 y β L2. La orientación de la hormona respecto al dominio de unión del ligando del hFSHR, faculta el establecimiento de contactos que estabilizan la hormona en una posición que permite que la FSH α establezca contactos con los lazos extracelulares de la TM. El potencial electroestático de las superficies en la interfaz hormona-receptor es predominantemente positivo



y negativo, respectivamente, indicando que hay interacciones directas entre residuos con cargas complementarias. En los FSHR de los peces prácticamente ninguno de los residuos sumergidos por la FSH β en la interfaz hormona-receptor humana, están conservados. De entre los que están sumergidos por la FSH α humana o por ambas FSH α y β humanas, menos de la mitad están conservados en los peces. La única excepción son los residuos pertenecientes a la LRR 4 (LRR 5 en los peces perciformes) que presentan un grado de conservación más elevado y se creó que interactúan, principalmente, con residuos de la FSH α .

Aunque en la especificidad de la unión podrían contribuir varias superficies de contacto, el análisis detallado de la estructura del complejo hFSH-hFSHR ha mostrado que en el hFSHR existe un número pequeño de residuos que potencialmente determinan la especificidad. Estos residuos son la Leu⁵⁵, Lys¹⁷⁹ y la combinación de Glu⁷⁶ y Arg¹⁰¹ y se localizan en la interfaz en la que el «seat-belt» (ver 2.2, mas arriba) de la hormona contacta con el receptor. No obstante, algunos de estos residuos no están conservados en los FSHRs de los peces. Otros se han conservado o han sido substituidos por residuos con características que permiten establecer las interacciones descritas en el caso del hFSHR, como es ejemplo la Leu⁵⁵. Una segunda característica de especificidad en el hFSHR es la formación de puentes de hidrógeno entre la Lys¹⁷⁹ y dos residuos de la FSH β . La interacción de estos residuos origina un canal cuyos lados están formados por dos aas de la FSH α , que establecen enlaces con dos residuos del receptor. Con la excepción de la tilapia y de la dorada, los residuos que ocupan posiciones homólogas a los de humano en los FSHRs y subunidades FSH α y β de los peces, están conservados o han sido substituidos por aas que siguen posibilitando las mencionadas interacciones. El tercer determinante de especificidad en el hFSHR implica aas que no están conservados en los peces y se basa en interacciones de dos residuos de la FSH β humana con dos residuos, Glu⁷⁶ y Arg¹⁰¹, del hFSHR. En el receptor humano estos dos residuos son estructuralmente adyacentes (uno al otro); sin embargo, en los peces perciformes la presencia de una inserción de 25 aas que codifica una LRR extra, originaría un giro adicional que separaría espacialmente estos dos residuos y por lo tanto, imposibilitaría la formación de enlaces equivalentes. Pese a las modificaciones estructurales de sus dominios



LRR, los FSHRs de estos peces responden a la FSH de mamíferos (ver a continuación), sugiriendo que esta interfaz hormona-receptor no es estrictamente necesaria para la activación del receptor.

Todavía no se conoce la estructura cristalina del LHR, pero se sabe que en rata seis aas del dominio extracelular del LHR que están involucrados en la unión al receptor (Bhowmick *et al.*, 1999), están conservados en los LHR de los peces, o han sido substituidos por aas de tamaño, forma y composición química parecidas. Otros estudios han demostrado que la hoja β de la tercera LRR de LHR humano que contiene determinantes de especificidad (Leung *et al.*, 2006), en particular la Asn¹⁰⁴, también se encuentra conservada en los LHR de los peces (Vischer *et al.*, 2003).

Especificidad de los receptores de las gonadotrofinas

Contrariamente a los GTHRs de los mamíferos, que son altamente específicos para sus ligandos afines (menos de 0,1% de actividad cruzada; Braun *et al.*, 1991; Moyle *et al.*, 1994), en los peces teleósteos la dualidad funcional y especificidad de los receptores de la FSH y de la LH parece ser menos aparente. Los ensayos *in vitro* con receptores recombinantes de dos especies de pez gato *Clarias gariepinus* y *Ictalurus punctatus* y del pez cebra *Danio rerio*, sugieren que los FSHRs no son selectivos para la FSH, aunque la FSH es ligeramente más potente que la LH como ligando, mientras que los LHRs son altamente selectivos para la LH (Bogerd *et al.*, 2001; Vischer y Bogerd, 2003; Kumar *et al.*, 2001a, b; Kwok *et al.*, 2005). Anteriormente se habían observado resultados similares en el salmón plateado, donde el FSHR no fue capaz de distinguir entre la FSH y la LH, mientras que el LHR apenas unió la LH (Yan *et al.*, 1992; Miwa *et al.*, 1994). No obstante, estos datos contrastan con los resultados obtenidos en otras especies de salmónidos. Por ejemplo, la estimulación del FSHR de salmón «ama-go» con FSH y LH purificadas de salmón «chum» (*Oncorhynchus keta*), dio lugar a una activación específica al no observase ningún efecto con la LH de salmón «chum». Sin embargo, células transfectadas con el LHR respondieran con una elevada sensibilidad a la LH y en menor magnitud, también a la FSH (Oba *et al.*, 1999ab). En la trucha arco-iris se observaron resultados similares, aunque en este caso, fueron nece-



sarias dosis supra-fisiológicas de FSH purificada de trucha arcoiris para activar el LHR recombinante de la misma especie, lo cual cuestiona la relevancia de esta interacción (Sambroni, *et al.*, 2007). Sin embargo, en un estudio también reciente (Ko *et al.*, 2007), los receptores del salmón «amago» respondieron de forma específica a la estimulación con hormonas recombinantes de la trucha *Brachymystax lenok*. En la carpa *Labeo rohita* la situación es aun más complicada, los dos GTHRs, purificados a partir de células foliculares de ovario, reconocieron la FSH y LH de salmón en ensayos de unión receptor-ligando, aunque con preferencia por sus ligandos afines (Basu y Bhattacharya 2002). Estos resultados, sin embargo, hay que interpretarlos con mucha precaución ya que se emplearon hormonas heterólogas. Pese a lo descrito anteriormente, estudios preliminares demuestran que los receptores de la FSH y de la LH de la lubina presentan especificidad de unión por sus ligandos afines (Rocha *et al.*, 2007). La estimulación de células que expresan de forma estable cada uno de los receptores con FSH y LH recombinantes de lubina, dio lugar a una activación específica dosis-dependiente, de cada uno de los receptores. A pesar de ello, se ha visto que el LHR de lubina también se activa cuando se estimula con LH y FSH bovinas, mientras que el FSHR apenas se activa en presencia de FSH bovina (Rocha *et al.*, 2007). Los receptores del pez cebra y salmón «amago» tuvieron un comportamiento similar. Tanto la LH como la FSH bovinas activaron sus LHRs, pero los FSHRs apenas respondieron a la estimulación con FSH bovina (Kwok *et al.*, 2005; Oba *et al.*, 1999a,b). Numerosos estudios demuestran que las hormonas de mamíferos pueden actuar de diferentes formas sobre los GTHRs de peces. En el pez gato (*Ictalurus punctatus*), la hFSH estimula preferentemente el FSHR con efectos muy reducidos sobre el LHR. Sin embargo, la hCG activa ambos receptores (Kumar *et al.*, 2001a,b). No obstante, en el pez gato Africano (*Clarias gariepinus*) la hFSH estimula ambos FSHR y LHR, mientras que la LH y la hGC apenas activan el LHR (Bogerd *et al.*, 2001; Vischer y Bogerd, 2003).

En acuicultura, con frecuencia se usan hormonas de mamíferos con el objetivo de solucionar disfunciones fisiológicas originadas por el confinamiento de los animales. No obstante, la complejidad observada, como consecuencia de la activación cruzada de los GTHRs, aconse-



ja prudencia en el uso de hormonas gonadotropas heterólogas, para el tratamiento de reproductores, en la práctica del cultivo de peces.

2.3.5. Expresión de los receptores de las gonadotrofinas

Expresión tisular selectiva

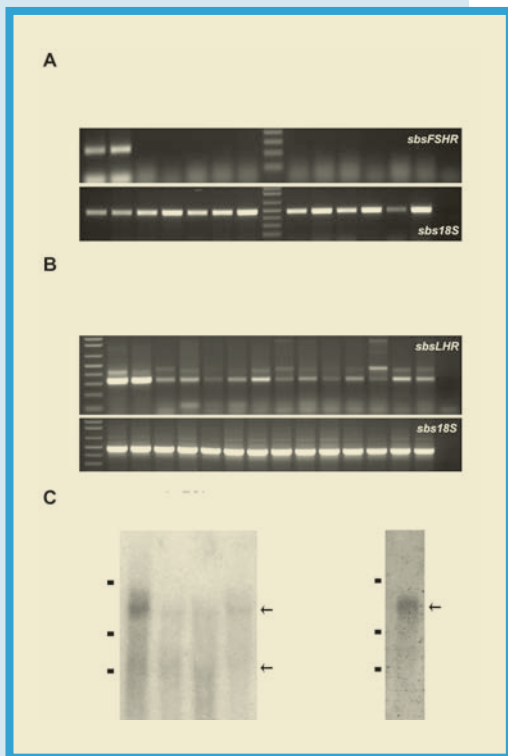
Tras la clonación de los cDNAs de los GTHRs de peces, se desarrollaron las herramientas moleculares necesarias para estudiar la expresión tisular de ambos receptores. Así, mediante RT-PCR, se observó que en el salmón «amago» la expresión de ambos receptores era muy específica ya que se detectaron exclusivamente en las gónadas (Oba *et al.*, 1999a,b). En contraposición, la expresión de estos transcritos en el pez gato Africano, el salmón del Atlántico y en la lubina se asemeja a la descrita en mamíferos ya que el FSHR se expresa exclusivamente en las gónadas, mientras que el LHR también lo hace en diferentes tejidos somáticos (Bogerd *et al.*, 2001; Vischer and Bogerd, 2003; Maugars y Schmitz, 2006; Rocha *et al.*, 2007) (Fig. 6). Se han encontrado niveles bajos de expresión extragonadal del FSHR en el bazo del pez gato y en el riñón del pez cebra (Kumar *et al.*, 2001b; Kwok *et al.*, 2005). En lo que respecta al LHR, se han localizado transcritos de este gen en el riñón cefálico, músculo, cerebro, vesícula seminal, riñón, hígado, corazón, estómago y branquias de diferentes especies de peces (Oba *et al.*, 1999a; Kumar *et al.*, 2001b; Vischer y Bogerd, 2003; Kwok *et al.*, 2005). En el pez gato Africano y en la lubina, la expresión extragonadal del LHR en el riñón cefálico es notable, incluso más elevada que en las gónadas.

Localización celular

Mediante estudios auto-radiográficos y previo a la clonación de los cDNAs de los GTHRs de peces, Miwa *et al.* (1994) observaron que en el folículo vitelogénico el FSHR se localizaba en las células de la teca, pero sobre todo en las de la granulosa y a su vez no se detectaba presencia del receptor del LHR. En el folículo pre-ovulatorio el FSHR estaba presente en las células de la teca, pero no en las de la granulosa que expresaban el LHR en gran cantidad. Durante la espermatogénesis el FSHR se localizo en las células de Sertoli y durante la espermiación se

**FIGURA 6.**

Análisis de la expresión del *FSHR* (A) y del *LHR* (B) de lubina en tejidos de peces adultos mediante RT-PCR. La integridad de los RNAs utilizados se verificó mediante amplificación uniforme del transcrito del *18S rRNA* de lubina. (C) Análisis *Northern blot*. Hibridación de RNA poly (A)⁺ de ovario de lubina (línea 1) y RNA total de testículo (líneas 2 y 3) y ovario (línea 4) de dos animales adultos con el cDNA completo del *sbsFSHR* usado como sonda (panel de la izquierda). Hibridación de RNA poly (A)⁺ de ovario con el cDNA completo del *sbsLHR* usado como sonda (panel de la derecha). El RNA en esta membrana es idéntico al de la línea 1 en el panel de la izquierda. Las flechas indican la posición de dos mRNAs del *sbsFSHR* de 1,8 y 3 kb, y un transcrito del *sbsLHR* de aproximadamente 3 kb. (Según Rocha *et al.*, 2007).



observo la presencia del LHR en las células de Leydig (Miwa *et al.*, 1994). Hibridaciones *in situ* realizadas en el salmón «amago» y en la tilapia (Oba *et al.*, 2001) mostraron que el FSHR se expresa en las células de la granulosa de los oocitos en vitelogénesis temprana y en las células de Sertoli. Por su parte, el LHR está presente en las células de la granulosa de los oocitos maduros y en las células de Leydig confirmando, en parte, lo que ya había sido observado anteriormente por Miwa *et al.*, (1994). Según un estudio inmunocitoquímico reciente, el FSHR está presente en el tejido testicular de la anguila japonesa durante todo el proceso de espermatogénesis, principalmente en las células de Leydig que son productoras de esteroides sexuales y en las células de Sertoli que rodean las espermatogonias del tipo A y las espermatogonias del tipo B en sus fases tempranas de desarrollo (Ohta *et al.*, 2007).



Expresión de los receptores de las gonadotrofinas y el desarrollo gonadal

En las hembras de los vertebrados superiores, los niveles de expresión del FSHR incrementan durante la maduración folicular y disminuyen drásticamente en el folículo postovulatorio, tras el pico de LH. Los niveles de expresión del LHR son mínimos en la fase folicular, incrementan en el folículo pre-ovulatorio y se mantienen elevados durante la fase de cuerpo luteo. En los machos, los niveles de expresión del FSHR varían de forma cíclica, según los estadios del ciclo del epitelio seminífero. En el momento de la espermiación la expresión de este receptor es mínima (Rannikko *et al.*, 1996). Los niveles elevados de expresión del LHR se corresponden con la presencia de células de Leydig maduras en el testículo.

En los teleósteos el conocimiento de los perfiles estacionales de expresión de los GPHRs está limitado a un número muy reducido de especies. En hembras, los perfiles de expresión de los GPHRs, durante el desarrollo gonadal, solo se ha estudiado en el pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Kumar *et al.*, 2001a, b) y en el pez cebra (Kwok *et al.*, 2005). Aunque estas dos especies presentan un tipo de desarrollo ovárico diferente (síncrono por grupos y asíncrono, respectivamente), los perfiles de sus respectivos GPHRs se parecen y recuerdan a lo observado en mamíferos. Ambos receptores se expresan de forma diferencial dependiendo del estadio de desarrollo del ovario; así pues, en el estadio de crecimiento primario tanto FSHR como LHR se expresan muy poco. La expresión del FSHR aumenta, de forma considerable, en el estadio de alvéolo cortical o previtelogénesis coincidiendo con la aparición y acumulación de los gránulos corticales en el citoplasma de los oocitos. Sin embargo, este aumento de la expresión del FSHR no va acompañado por un aumento del LHR. Durante la vitelogénesis se observa un incremento continuado de la expresión de FSHR que alcanza un pico de expresión máximo. En esta fase se empieza a detectar expresión del LHR. Al final del crecimiento del oocito o post-vitelogénesis, tiene lugar una disminución importante de la expresión del FSHR. En contraste, la expresión del LHR llega a su nivel máximo (Kumar *et al.*, 2001a, b; Kwok *et al.*, 2005). Estos perfiles de expresión implican al FSHR en los



procesos de la vitelogénesis y al LHR en los de maduración del oocito y/o ovulación. Los patrones de expresión de las subunidades FSH- β y LH- β en el pez gato (*Ictalurus punctatus*), son muy similares a la expresión ovárica de sus respectivos receptores (Kumar y Trant, 2004). Sin embargo, durante el desarrollo ovárico del pez cebra los patrones de expresión de la FSH β y LH β se solapan (So *et al.*, 2005). Además, el FSHR del pez cebra se comporta de forma promiscua (ver más arriba) (Kwok *et al.*, 2005) por ello, para comprender el papel de las GTHs en el desarrollo y función ovárica de esta especie es preciso conocer los perfiles plasmáticos de cada una de las hormonas, los mecanismos de señalización activados por cada uno de los receptores y el efecto o efectos interactivos resultantes de la activación/ coactivación de los mismos. Recientemente, se ha estudiado la expresión temporal de los GTHRs en el ovario del salmón plateado (Campbell *et al.*, 2006) y de la trucha arcoiris (Bobe *et al.* 2004), aunque solo durante la fase de crecimiento previtelogénico y la de adquisición de capacidad madurativa del folículo ovárico y maduración, respectivamente. Al contrario de lo descrito en el pez gato y en el pez cebra, durante el periodo de acumulación de los gránulos corticales en el citoplasma de los oocitos, la expresión del FSHR en las gónadas de salmón plateado no varió en relación a los perfiles de la FSH en la pituitaria y en el plasma, que registraron un aumento significativo. Durante este periodo el LHR también se expresó, aunque a niveles muy bajos (Campbell *et al.*, 2006). En la trucha, se observó un aumento de la expresión del FSHR hacia el final del proceso de adquisición de la capacidad madurativa del folículo ovárico (Bobe *et al.* 2004). Esta expresión siguió siendo importante durante la maduración del oocito, lo cual sugiere que el FSHR podría intervenir en la maduración y posiblemente en la ovulación (Bobe *et al.* 2004). Este perfil concuerda con un aumento de los niveles circulantes de FSH observados en la trucha arcoiris antes de la maduración de los oocitos (Planas *et al.* 2000). En cambio, los niveles de expresión del LHR bajaron ligeramente durante la maduración del oocito, aunque esta variación no fue significativa respecto a los niveles registrados durante la adquisición de la capacidad madurativa del folículo ovárico (Bobe *et al.* 2004).

Todavía se sabe poco acerca de la expresión temporal de los receptores de las gonadotrofinas durante la espermatogénesis. En la



trucha arcoiris, los niveles del FSHR aumentan, de forma significativa, en el momento de la aparición de las espermátidas y del esperma y fluctúan durante el resto del ciclo sexual sin que se registren cambios significativos de expresión (Kusakabe *et al.*, 2006). Por el contrario, la expresión del LHR presenta un incremento continuado desde el inicio de la espermatogénesis media, alcanzando su máximo a mitad de la espermatogénesis tardía. Los niveles de este transcrito bajan ligeramente cuando el esperma es dominante en el testículo (Kusakabe *et al.*, 2006). Así pues, en la trucha, los incrementos de la LH en plasma, durante la espermatogénesis, ocurren de forma paralela a los incrementos de transcripción del LHR. En los salmónidos durante la espermatogénesis los niveles de la FSH en plasma son substancialmente más elevados que los de la LH. A pesar de ello, se baraja la posibilidad de que el principal factor que regula la producción de esteroides, por parte del testículo, sea un aumento de la señalización del LHR presente en las células de Leydig.

El estudio de la expresión de los GTHRs, llevado a cabo en la lubina, sugiere que en hembras los perfiles de expresión de ambos receptores son muy parecidos aunque, la presencia de transcritos del FSHR se anticipa ligeramente a la de los de LHR. En machos, ambos receptores muestran un perfil bimodal de expresión y el pico máximo del FSHR se anticipa respecto al del LHR (Rocha *et al.*, 2009). Dado que no se vislumbran diferencias importantes en los perfiles de expresión del FSHR y del LHR, se podría pensar que ambos receptores están implicados en la totalidad del proceso de desarrollo gonadal de esta especie. Estudios de hibridación *in situ*, en ovarios de lubina, mostraron una elevada expresión del FSHR en las células foliculares de oocitos en previtelogénesis y en estadios tempranos de la vitelogénesis. Sin embargo, los folículos maduros mostraron muy poca o ninguna expresión (Rocha *et al.*, 2007). La lubina presenta un desarrollo ovárico del tipo sincronía por grupos, es decir desova tres a cuatro tandas de gametos, en rápida sucesión y el reclutamiento de las sucesivas tandas ocurre a partir de oocitos en varios estadios de la fase de crecimiento secundario. Por lo tanto, el perfil de expresión de cualquier gen refleja el promedio de la población de los folículos existentes en el ovario, en el momento del muestreo ya que es posible encontrar una mezcla de oocitos en dife-



rentes estadios de desarrollo folicular. Este hecho justifica el que no haya diferencias entre los perfiles de expresión de los dos receptores en las hembras de esta especie (Rocha *et al.*, 2009).

2.4. LAS GÓNADAS

2.4.1. Origen y organización anatómica

En todos los vertebrados las gónadas se forman a partir del desarrollo coordinado de dos linajes celulares distintos: las células germinales también conocidas como células germinales primordiales (PGC) y el mesodermo gonadal somático que las rodea. En los mamíferos y otros tetrápodos las glándulas adrenales y las gónadas se desarrollan a partir de un primordio común situado cerca del lado dorsal del epitelio celómico, en la región donde se desarrolla el tejido del mesonefros. La proliferación más lateral o córtex da lugar al ovario y la porción medular da origen a los testículos y al tejido adrenocorticotropo. En estado indiferenciado las mencionadas formaciones coexisten y en un momento determinado, una de ellas empieza a desarrollarse mientras la otra se inhibe. En peces teleósteos la gónada deriva de un solo primordio germinal desarrollándose directamente de la parte correspondiente al córtex de los vertebrados. Los estudios más claros y recientes acerca de la formación de las gónadas se han realizado en la medaka japonesa (*Oryzias latipes*) donde se ha corroborado que básicamente, las gónadas se forman sin que en ello contribuya significativamente el mesonefros. En esta especie, durante la gastrulación tardía, unas pocas células germinales situadas alrededor de la región posterior del esbozo embrionario migran, después del alineamiento bilateral, hasta formar un primordio en la región dorsal del epitelio celómico. Posteriormente se forman dos grupos, uno a cada lado, que darán lugar a las gónadas. Este tipo de organización tan particular podría ser responsable de la gran diversidad de patrones sexuales existentes entre los peces teleósteos. Para mayor información acerca del origen de las gónadas y diferenciación sexual de los teleósteos son recomendables Devlin and Nagahama 2002, Nakamura *et al.*, 2006, Piferrer (Capítulo V, este volumen).



En la gran mayoría de peces las gónadas, testículos y ovarios son órganos pares situados en posición dorso-lateral, una a cada lado del mesenterio dorsal, en la cavidad peritoneal. Los testículos de los teleósteos son dos órganos alargados y unidos por la pared dorsal de la cavidad corporal. El espermiducto sale de la superficie medio dorsal posterior de cada testículo y desemboca en la papila urogenital, situada entre el recto y los ductos urinarios. El ovario de los teleósteos puede ser un saco cerrado que comunica con la cloaca mediante el oviducto o un conjunto de folículos que se abren a la cavidad corporal. Está constituido por muchos septos de tejido conectivo o laminillas ováricas que se proyectan hacia el lumen, donde se desarrollan los oocitos. En los apartados posteriores se describen más al detalle el desarrollo testicular y ovárico y su control endocrino.

2.4.2. Estructura y desarrollo testicular

Según Billard (1986) en los peces teleósteos existen dos tipos de estructura testicular: la tubular y la lobular. En la primera el testículo posee una cavidad central desde la que irradian túbulos hacia la periferia. En este tipo de estructura, las espermatogonias primarias están situadas en el apex o extremo ciego de los túbulos y la espermatogénesis progresa hacia el extremo abierto de la cavidad central del testículo, donde se encuentran los espermatozoides. El tipo lobular es el más común entre los teleósteos Perciformes y es al que nos referiremos en esta revisión, porque muchas de las especies importantes en piscicultura marina pertenecen a este grupo. Este tipo de estructura testicular consiste en lóbulos, ramificados y anastomosados entre sí, donde se encuentran los espermatocistes, que son las unidades funcionales estructurales del testículo donde tiene lugar la espermatogénesis (Fig. 7A).

El testículo de los peces teleósteos está constituido por dos compartimentos, el lobular y el intersticial; en un principio el primero contiene espermatogonias y células somáticas asociadas a ellas o células de Sertoli. Un lóbulo testicular está constituido por varios espermatocistes. El espermatociste más simple lo constituye una sola espermatogonia (primaria) rodeada por una o unas pocas células de Sertoli (Fig 7A). Las espermatogonias primarias, tras las divisiones, subsiguientes dan lugar a las secundarias y estas por meiosis a los espermatocitos, espermátidas



y espermatozoides (Fig 7B-F). Los espermatocistes están rodeados por las células de Sertoli quienes llevan a cabo una función de atención y mantenimiento que es crucial para la espermatogénesis. Estas células, a su vez, están en contacto con la membrana basal que separa el compartimiento lobular del intersticial. Durante la espermiación las células de Sertoli se separan y el espermatociste libera los espermatozoides a la luz del lóbulo, desde donde van al espermiducto.

En el compartimiento intersticial, situado entre los lóbulos, hay fibroblastos, vasos sanguíneos y linfáticos y las células de Leydig que son de origen somático. Estas células son la fuente principal de esteroides testiculares, como se demuestra tanto por inmunohistoquímica, en relación con la presencia de varios enzimas responsables de la síntesis de hormonas esteroides, como por su ultraestructura típica propia de las células productoras de esteroides (Nagahama 1994; Yaron and Sivan 2006).

Una diferencia importante entre los vertebrados amniotas y los peces teleósteos es el tipo de espermatogénesis. En los amniotas, en un momento preciso, una célula de Sertoli contacta con varios clones de células germinales a la vez, pero solo puede mantener un cierto número de ellas que es característico de cada especie y que en última estancia, determina el tamaño del testículo y la cantidad de esperma producido (Petersen and Söder 2006). En los peces teleósteos la espermatogénesis es cística y ello implica que todas las células germinales de un espermatociste determinado deriven de una sola espermatogonia primaria. Esta, al dividirse sincrónicamente, constituye un clon de células germinales isogénicas bordeadas por extensiones citoplasmáticas de las células de Sertoli que les acompañaran durante todo el proceso de espermatogénesis (Schulz *et al.*, 2005). Durante la fase mitótica, las células germinales de un espermatociste aumentan en número al igual que las células de Sertoli asociadas y a diferencia de lo que ocurre en los mamíferos, con la fase meiótica la proliferación de estas no cesa pero se reduce considerablemente (Schulz *et al.*, 2005). La barrera de células de Sertoli, regula y proporciona la entrada de nutrientes, factores de crecimiento y de diferenciación y de mitógenos apropiados a las células germinales, a la vez que las protege de agentes dañinos y de su propio sistema inmune. En los peces los cambios morfológicos

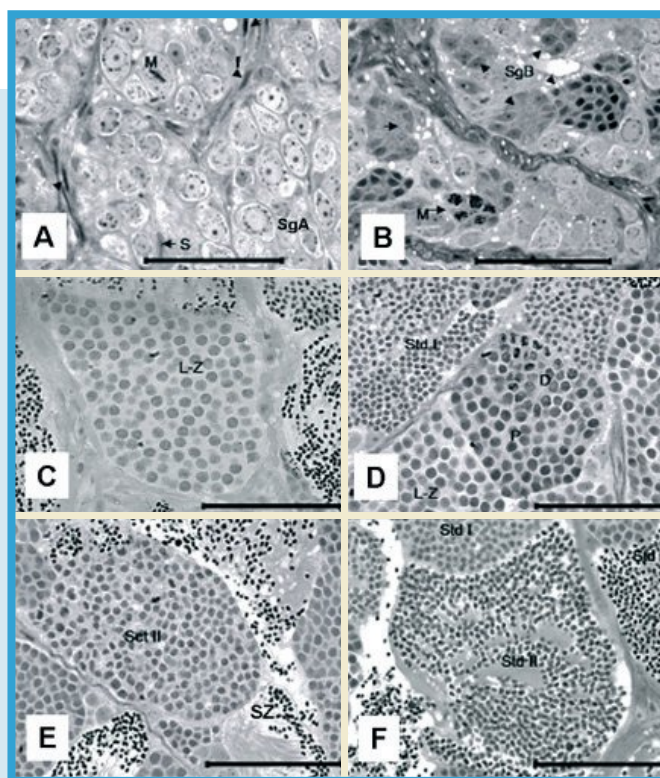


FIGURA 7.

Microfotografías del testículo de lubina mostrando los diferentes tipos de células germinales. [A] Testículo inmaduro en el que se observan tres lóbulos testiculares con espermatogonias primarias (SgA) que se renuevan por mitosis (M), células de Sertoli (S) bordeando los espermatocistes de espermatogonias A y fibroblastos (►) en el tejido intersticial interlobular. [B] Testículo iniciando la espermatogénesis. Se observa la presencia de diferentes generaciones de espermatogonias A y espermatocistes de espermatogonias secundarias (SgB, ►) que proliferan por mitosis (M). Se observa bien la diferencia de tamaño y morfología entre las espermatogonias A y B. Cada espermatogonia da lugar a un clon de células germinales isogénicas que a su vez dará lugar a un espermatociste de espermatozoides. [C] Ciste de espermatocitos primarios (Sct I) en fase de Leptonema – Zigonema de la primera división meiótica (L-Z). [D] Espermatocistes en las tres fases de la primera división meiótica (L-Z, P, D) y espermátidas primarias (Std I). E] Espermatocitos de segundo orden Sct II y espermatozoides (SZ). [F] Los tres tipos de espermátidas, redondas, tipo croissant y alargadas (Std I, Std II, Std, respectivamente). Barra 50 μ m. (Lámina modificada de O. Yilmaz, Master de Acuicultura; Universidad de las Palmas de Gran Canaria, Instituto de Ciencias Marinas y CIHEAM-IAMZ).



y fisiológicos del testículo, observados durante el proceso reproductor, están asociados al ciclo de espermatogénesis que según Miura y Miura (2003) esta dividido en los siguientes estadios: renovación de las espermatogonias, proliferación de las mismas hasta la meiosis, divisiones meióticas, espermiogénesis y maduración del esperma. Cada uno de ellos, esta regulado hormonalmente de forma diferente.

2.4.3. La espermatogénesis y su regulación endocrina

Para un mejor seguimiento de este apartado, en la Figura 8 se muestra un esquema que sintetiza, de forma resumida, los diferentes mecanismos regulados por las gonadotrofinas y los esterides gonadales que configuran el posible control endocrino de la espermatogénesis en la anguila japonesa.

Las espermatogonias se renuevan por mitosis dando lugar a otras espermatogonias o células madre (espermatogonias primarias) pero quienes a su vez, también son objeto de una proliferación espermatogonial que desemboca en meiosis (Fig 7A-B). Las últimas investigaciones en teleósteos demuestran que ambos eventos se regulan de manera diferente (Miura y Miura, 2003). En la anguila japonesa (*Anguilla japonica*) y en *Hucho perryi*, el 17β -estradiol (E_2) promueve la renovación de las espermatogonias primarias (Miura *et al.*, 1999 y Amer *et al.*, 2001), pero no la proliferación espermatogonial responsable de la meiosis (Miura *et al.*, 2003). Algo parecido se ha visto en ratas donde el E_2 induce la proliferación de los gonocitos testiculares debido a su acción estimuladora de la secreción del factor de crecimiento de las plaquetas (PDGF; platelet derived growth factor) (Li *et al.*, 1997; Thuillier *et al.*, 2003). En los machos de los teleósteos se ha detectado tanto la presencia de E_2 en plasma (Amer *et al.*, 2001), como la expresión de receptores de estrógenos en el testículo (Halm *et al.*, 2004) y además, en la anguila japonesa, dicha expresión fue muy notable en las células de Sertoli (Miura *et al.*, 1999). Paralelamente, en esta misma especie, se identificó un clon de cDNA inducido por efecto del E_2 , denominado eSRS34 (sustancia 34 relacionada con la espermatogénesis de la anguila) que se expresa en las células de Sertoli y cuya forma recombinante induce la renovación de las espermatogonias madre, pero no la proliferación espermatogonial dirigida hacia la meiosis. Dicha sustancia



comparte cierta homología con el factor de crecimiento celular endotelial derivado de las plaquetas (PD-ECFG), lo cual sugiere una cierta similitud con el mecanismo observado en mamíferos y comentado en líneas anteriores (Miura *et al.*, 2003).

En el momento en que se secreta GTH desde la pituitaria, las mitosis espermatogoniales ya no dan lugar a espermatogonias madre y la proliferación cambia de sentido hacia la meiosis iniciándose así la espermatogénesis (Miura *et al.*, 2003). Cuando esta se inicia, el número de espermatogonias incrementa en progresión geométrica y el número de ciclos celulares mitóticos que tienen lugar, antes de la primera meiosis, es característico de cada especie. Por ejemplo en el guppy son catorce, en la anguila japonesa diez, en el pez cebra cinco o seis (Schulz and Miura 2002) y en la lubina ocho (Yilmaz, Carrillo y Zanuy datos no publicados). Cada generación de espermatogonias se distingue de la otra por un conjunto de diferencias morfológicas de entre las cuales el incremento de la heterocromatina y la disminución del tamaño celular y nuclear son las más evidentes (Fig 7B). En peces no hay una terminología unificada para denominar a cada una de las generaciones de espermatogonias, pero parece adecuada la de As para las espermatogonias primarias y A1-n para las sucesivas generaciones. La última generación se designa como espermatogonias B, estas experimentan la última mitosis que dará origen a los espermatocitos primarios quienes, tras la primera división meiótica, dan lugar a los espermatocitos secundarios (Fig 7C-E). Estas últimas células son de vida muy corta y después de la segunda división meiótica se convierten en espermátidas que durante la espermiación sufren una serie de transformaciones que las convierten en espermatozoides (Fig. 7D y F). Cuando se ha completado la espermiogénesis los espermatozoides son liberados a la luz tubular y de allí al conducto deferente desde donde son emitidos al exterior. En algunas especies como la lubina, salmón o anguila, los espermatozoides intratesticulares tienen una capacidad fertilizadora nula o muy reducida y solo tras pasar por el canal deferente alcanzan esta competencia (Schulz y Miura, 2002, para una información más detallada). Como ya mencionábamos anteriormente, el cambio de sentido de la proliferación mitótica de las espermatogonias hacia la meiosis, es decir el inicio de la espermatogénesis, depende de la estimulación gona-



Esquema que muestra el posible mecanismo de control endocrino del proceso de espermatogénesis en *Anguilla japonica* (según Miura *et al.* 1991, 1999, 2003, 2006 y 2007, Miura y Miura 2003 y Ozaki *et al.*, 2006). Los recuadros naranja y azul representan los compartimentos somático y germinal del testículo, respectivamente. Las flechas y líneas de distinto color, simbolizan distintos mecanismos de control endocrino. En el recuadro amarillo se muestra el mecanismo mediante el cual (Ozaki *et al.*, 2006) la DHP, bajo niveles óptimos de cortisol, acentúa la acción de la 11KT al inducir la actividad 11-HDS que convierte el cortisol (glucocorticoide activo) en cortisona (glucocorticoide inactivo). CAII, anhidrasa carbónica; DHP, 17 α , 20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona; E₂, 17 β Estradiol; eSRS (21, 22 y 34) sustancias descubiertas mediante rastreo de expresión de genes relacionadas con la espermatogenesis de la anguila; FSH, hormona folículoestimulante; 11-HDS, 11 β Hidroxiesteroide deshidrogenasa; IGF, factor de crecimiento de tipo insulina tipo I; 11KT, 11-cetotestosterone. (modificado de Yaron y Sivan, 2006).



FSH parece ser la mas importante en la regulación tanto de la esteroidogénesis, como de la espermatogénesis en el testículo inmaduro de la anguila japonesa (Kazeto *et al.*, 2008).

En los mamíferos la LH actúa a través de su receptor (LHR) estimulando la producción de andrógenos por las células de Leydig. Estos difunden hacia los túbulos seminíferos donde dirigen la espermatogénesis y además, participan en los mecanismos de retroalimentación positiva y negativa en el cerebro e hipófisis. La FSH estimula directamente a su receptor (FSHR) en las células de Sertoli que a su vez, son responsables de la supervivencia y desarrollo de las células germinales. En los peces aparentemente la situación es más complicada ya que ambas gonadotrofinas estimulan la esteroidogénesis (Planas y Swanson 1995; y revisiones de Schulz y Miura, 2002 y Yaron y Sivan, 2006 para mas detalle). Hasta hace poco se creía que al igual que en los mamíferos, en los peces las células de Leydig expresaban el LHR y las de Sertoli el FSHR. No obstante, los últimos estudios en anguila japonesa (Ohta *et al.*, 2007), bagre africano y pez cebra (García-López *et al.*, 2009) demuestran que el FSHR se expresa tanto en las células de Sertoli que rodean a las espermatogonias A y las B tempranas, como en las de Leydig, responsables de la producción de esteroides. Así pues, la administración de FSH recombinante (rFSH), *in vitro*, indujo la espermatogénesis completa desde la proliferación espermatogonial hasta la espermiogénesis. A su vez la espermatogénesis fue inhibida por la adición de trilostano (un inhibidor de la 3β -hidroxi-esteroid-deshidrogenasa), pero no en presencia de 11KT (Ohta *et al.*, 2007). En los peces este andrógeno esta considerado como el regulador más importante de la espermatogénesis, al menos desde la proliferación espermatogonial hasta la espermiogénesis. El estudio de Ohta *et al.* (2007) demuestra que en la anguila japonesa una de las principales funciones de la FSH es inducir la espermatogénesis vía estimulación de andrógenos. Por otra parte, la administración de FSH recombinante *in vivo* a anguilas inmaduras indujo el incremento de los niveles de 11KT en plasma y la espermatogénesis (Kamei *et al.*, 2006). Mas recientemente se ha visto que en la lubina, un teleosteo perciforme, la FSH nativa no solo estimula la liberación *in vitro* de 11KT, de manera tiempo y dosis dependiente, sino que su capacidad estimuladora es más elevada en testículos pro-



cedentes de machos en recrudescencia temprana (inicio espermatogénesis) (Molés *et al.*, 2008). Resumiendo, las gonadotrofinas (casi con toda seguridad la FSH) provocan un incremento súbito en la secreción de 11KT por parte de las células de Leydig. Este andrógeno, a su vez, estimula a las células de Sertoli para que produzcan otros mediadores, posiblemente factores de crecimiento como la activina B y o el factor de crecimiento de tipo insulina tipo I o somatomedina (IGF-I) (Miura y Miura, 2003). Además, así mismo en la anguila japonesa, se ha demostrado que los testículos inmaduros expresan una sustancia que previene la espermatogénesis. Esta sustancia, inicialmente denominada eSRS21 (sustancia 21, relacionada con la espermatogénesis de la anguila), presenta una gran similitud con la hormona anti-Mulleriana (AMH) que ha sido identificada recientemente en peces (Halm *et al.*, 2007). La eSRS21 se expresa en las células de Sertoli de la anguila japonesa inmadura, pero desaparece ante la estimulación de la gonadotrofina. Además, la 11KT inhibe su expresión *in vitro* pero, si al cultivo se añade el péptido recombinante, la proliferación espermatogonial inducida por la 11KT no tiene lugar. Estas y otras evidencias (Miura *et al.*, 2002 y Miura y Miura, 2003) indican que esta sustancia previene la espermatogénesis. Por tanto todos los indicios sugieren que la FSH estimula la producción de 11KT y que además, la activina B (y posiblemente otros factores de crecimiento) y la eSRS21 juegan papeles opuestos en el inicio de la espermatogénesis. Mientras que la activina B la iniciaría, la eSRS21 evitaría que este inicio tuviera lugar (Miura y Miura, 2003, Yaron y Sivan, 2006).

Aparte de este mecanismo, ligado a factores de crecimiento, existe otro mecanismo dependiente de la esteroideogénesis gonadal dirigido, muy probablemente, en primer término por la LH. Además de su reconocido papel en el proceso de maduración del folículo (Ver J. Cerdá, Capítulo VII, este mismo volumen) y en la espermiación y maduración del esperma (ver más abajo), recientemente se ha demostrado que la 17α , 20β dihidroxi-4-pregnen-3-ona (DHP) es un factor fundamental en la espermatogénesis temprana puesto que es esencial para el inicio de la meiosis de la última generación de espermatogonias (Miura *et al.*, 2006). Así pues, la proliferación espermatogonial se iniciaría por acción de la 11KT, después la DHP, producida como respuesta a la 11KT,



induciría las divisiones meióticas. A su vez, esta progestina, también ejercería un control de retroalimentación positiva de la producción de 11KT, a partir de niveles óptimos de cortisol, mediante inducción de la expresión de la 11-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa (11-HDS) (Ozaki, *et al.*, 2006), promoviendo así la progresión de la espermatogénesis hasta la producción del esperma.

En muchas especies de peces el esperma presente en el testículo, tras completarse la espermiogénesis, no es motil y tampoco lo es cuando está en el espermiducto. El esperma solo adquiere motilidad y capacidad para fecundar una vez diluido en agua dulce o marina, según se trate de especies dulceacuícolas o marinas. Ello indica que, una vez finalizada la espermiogénesis, el esperma pasa por un proceso de capacitación que implica a una serie de cambios fisiológicos que tienen lugar en el espermiducto (Miura y Miura, 2003). En salmónidos, uno de estos cambios fisiológicos que culminará con la maduración del esperma es el incremento del pH del plasma seminal en el espermiducto que, a su vez, se traduce en un incremento de los niveles de cAMP intra-espermático. También se han observado resultados similares, de forma experimental, en la anguila japonesa (Miura y Miura, 2003).

Al igual que las otras etapas de la recrudescencia testicular, la maduración del esperma esta regulada por el sistema endocrino y existen pruebas claras de que los progestágenos DHP y/o 17α , 20β -21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona (20β -S) podrían ser mediadores de esta función. Se ha sugerido que los espermatozoides poseen receptores para estos progestágenos (Thomas *et al.*, 1997, Miura y Miura, 2003), también conocidos como esteroides u hormonas inductoras de la maduración (MIS o MIH, respectivamente). De hecho se ha propuesto que la mediación de los progestágenos se haría a través de su acción sobre una anhidrasa carbónica (CA), también denominada eSRS22 en la anguila, implicada en la regulación iónica y balance ácido base. El mecanismo que se sugiere sería el siguiente el DHP o MIH actuaría directamente sobre el espermatozoide e induciría la activación de la CA/eSRS22 (anguila) (Miura y Miura 2003). Esta activación enzimática sería responsable del aumento del nivel de cAMP del esperma y del incremento del pH del plasma seminal. Como consecuencia de ello, el esperma adquiere motilidad como se ha comprobado experimentalmente en el salmón masu (Miura y Miura,



2003). La capacitación del esperma esta acompañada por la producción de fluido en el espermiducto y es conocido como proceso de hidratación testicular que como hemos visto esta regulado por las gonadotrofinas (probablemente LH) y los esteroides gonadales.

La mayoría de mecanismos expuestos anteriormente han sido demostrados, mediante estudios *in vitro*, en la anguila japonesa y sin duda son extrapolables a otras especies de teleósteos. De hecho, algunos de ellos han sido probados experimentalmente *in vivo* en algunas especies de salmónidos. No obstante, el número de especies de teleósteos es altísimo y en algunas de ellas los machos poseen estrategias reproductivas muy peculiares. Por tanto, sería deseable que estudios similares se extendieran a otras especies, muy particularmente a peces marinos de interés para la acuicultura.

2.4.4. Estructura del ovario y tipos de desarrollo ovárico

El ovario de los teleósteos puede variar desde un simple saco a un órgano complejo con funciones tales como producción de oocitos, almacenaje de esperma y lugar de fertilización y alimentación para el desarrollo del embrión. En la Figura 9 se muestra un ovario al inicio de la diferenciación en la que se puede ver claramente como se estructurara posteriormente. El ovario de los teleósteos posee un epitelio germinal derivado de una extensión del peritoneo que da lugar a los folículos ováricos. Justo por debajo del epitelio germinal se extiende la túnica albugínea que es una capa muy densa de tejido conectivo con músculos de fibra lisa y vasos sanguíneos. Los folículos formados a partir del epitelio germinal, que recubre toda la parte interna del ovario, están embebidos en el estroma ovárico que se extiende a partir de la túnica albugínea hacia el interior de la glándula. A su vez, la parte interna del epitelio se pliega dando lugar a las laminillas ováricas, en las que se disponen los folículos constituidos por el oocito y las envolturas foliculares (Fig. 10).

Atendiendo al ritmo de desarrollo de los oocitos intraováricos se han distinguido tres tipos de ovarios (Zanuy y Carillo, 1987):

a) Sincronismo. La sincronía ovárica implica que todos los oocitos de un mismo ovario estén en el mismo estado de desarrollo. Es propio de aquellas especies que ponen una sola vez en la vida como los salmones del pacífico. Al salmón del Atlántico y a la trucha se les considera dentro de este grupo, aunque se suelen reproducir anualmente.

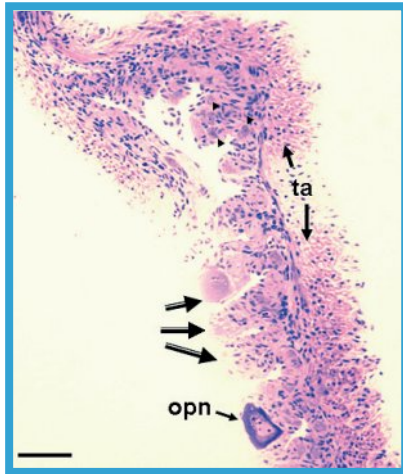


FIGURA 9. Microfotografía de un ovario de un alevín de lubina diferenciándose. Se observan claramente las laminillas ováricas (flechas), formadas por el repliegue del epitelio germinal que recubre la parte interna del ovario, que serán el soporte y lugar de desarrollo de los folículos ováricos. Se observa la túnica albugínea (ta) y diversas oogonias, inmersas en el estoma ovárico, (►) que al individualizarse y entrar en la profase de la primera meiosis dan lugar a los folículos perinucleolares (opn). Barra 50 mμ.

b) Sincronismo por grupos. En este caso el ovario posee, al menos, dos grupos de oocitos en estado de desarrollo distinto. Los peces que pertenecen a este grupo ponen entre una y 4-5 veces por época de puesta y su intervalo de puesta es relativamente corto. Las diferentes especies de mugiles y lubinas o el bacalao y la merluza pertenecen a este grupo y muestran un pico claro de puesta anual.

c) Asincronismo. Este tercer grupo se caracteriza porque el ovario en recrudescencia posee oocitos en todos los estados de desarrollo. Los peces

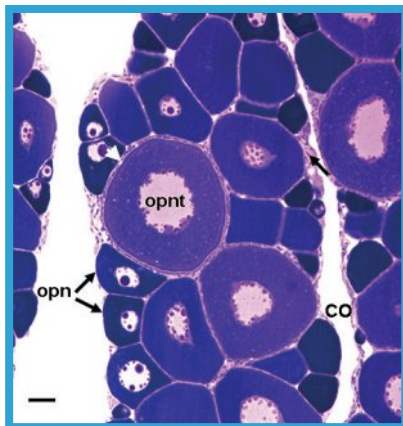


FIGURA 10. Microfotografía mostrando un ovario en inicio de la segunda fase de desarrollo. Se observan numerosos oocitos previtelogénicos en distintos estadios de desarrollo folicular primario (opn, oocito perinucleolar) y unos pocos al inicio del crecimiento secundario (opnt, oocito perinucleolar tardío), dispuestos en el interior de las laminillas ováricas. co, cavidad ovárica; flecha, nido de oogonias; punta de flecha blanca, capas foliculares y zona radiata. Barra 25 mμ.



de este grupo se caracterizan porque ovulan y emiten oocitos en repetidas ocasiones durante la época anual de puesta que suele ser muy dilatada. La dorada, el lenguado y el rodaballo pertenecen a este tercer grupo.

Como en la mayoría de los vertebrados inferiores, el crecimiento del oocito es largo y el aumento de tamaño, desde las primeras fases de su desarrollo hasta la ovulación, es considerable. En los teleósteos, excepto en aquellas especies que desovan una sola vez en su vida, cada año se forman nuevos oocitos como consecuencia de las divisiones oogoniales. Estos oocitos de nueva formación no maduraran hasta la próxima época de puesta. Durante el proceso de recrudescencia ovárica tienen lugar una serie de acontecimientos que se describen a continuación.

2.4.5. Previtelogénesis y su control endocrino

Durante el proceso de diferenciación ovárica de los teleósteos las PGC indiferenciadas dan lugar a las oogonias que generalmente están agrupadas en nidos. Estas, tras varias divisiones mitóticas, inician su primera división meiótica dando lugar a los oocitos primarios que se aíslan y rodean de una capa plana de células somáticas epiteliales especializadas o células de la granulosa. Estas células secretan la membrana basal y alrededor de ella se organiza otra monocapa de células somáticas procedentes del tejido conectivo del estroma o teca. Durante la profase de la primera división meiótica el núcleo de los oocitos pasa a través de cinco estados sucesivos: leptoteno, zigoteno, paquiteno, diploteno y diacinesis. El oocito y sus correspondientes envolturas foliculares forman el folículo por lo que a partir de ahora lo denominaremos así ya que constituye la unidad ovárica esencial (Fig. 10). El crecimiento primario del folículo tiene lugar durante los tres primeros estados de profase de la primera división meiótica. Esta se para al final de la profase, en el estado de diploteno, durante un tiempo determinado que en los teleósteos puede variar entre unos pocos días y algunos meses. En esta parada meiótica tiene lugar la segunda fase de crecimiento del folículo que a su vez, atendiendo a los acontecimientos que tienen lugar, se puede subdividir en previtelogénesis media y tardía y vitelogénesis. Durante la segunda fase de crecimiento folicular, el oocito acumula mRNAs, reservas nutricionales y diversos componentes que servirán para que, cuando se reinicie la meiosis, o proceso de maduración, este se desarrolle correctamente. A la vez también se utilizarán para que posteriormente,



culminen con éxito el proceso de fertilización y el desarrollo embrionario y larvario. A medida que se va desarrollando el folículo, durante el crecimiento previtelogénico (Fig. 10), el oocito aumenta extraordinariamente de tamaño y en el núcleo tienen lugar toda una serie de transformaciones que están asociadas a la profase de la primera meiosis (Le Menn *et al.*, 2007, para una descripción más detallada). A estos folículos se les denomina en estado perinucleolar por la presencia, en la periferia del núcleo, de numerosos nucleolos que producen ribosomas. En este período tiene lugar una activa e intensa síntesis de RNA ribosómicos (rRNA) y RNA mensajeros (mRNAs), que son transportados al ooplasma. Una vez allí, estos mensajeros codifican proteínas relacionadas o necesarias para los acontecimientos posteriores propios de la vitelogénesis, como por ejemplo los receptores de vitelogenina y los enzimas proteolíticos responsables de procesar el vitelo (catepsinas). Se cree que prácticamente todo el RNA presente en el oocito y necesario para el desarrollo posterior, se sintetiza durante este período, (Song y Wessel 2005 y Le Menn *et al.*, 2007). Por ejemplo, recientemente, en los oocitos en previtelogénesis del salmón coho, se han identificado mediante hibridación recíproca sustractiva (SSH) y PCR cuantitativo (qPCR) una serie de genes que tienen un papel muy importante durante la ovogénesis (Luckenbach *et al.*, 2008). Estos genes codifican proteínas relacionadas con el desarrollo de la zona radiata, el secuestro y proceso de las lipoproteínas, el control del ciclo celular y la respuesta de fertilización, entre otras. Durante el crecimiento medio y tardío del folículo en previtelogénesis, o inicio del crecimiento secundario folicular (Fig. 11 izquierda), el oocito sintetiza grandes cantidades de glicoproteínas que son incorporadas en los alvéolos corticales (anteriormente impropriamente denominados vesículas de vitelo) (Fig. 13, inserto). Al inicio, los alvéolos corticales están situados en la periferia del oocito y a medida que progresa el desarrollo folicular se van acumulando centripetamente hacia el núcleo.

Estas estructuras son muy importantes por su participación en la reacción cortical que tiene lugar en el momento de la fertilización del oocito y por su papel durante la embriogénesis temprana. Después de la fertilización, los alvéolos corticales se funden con la membrana del oocito y sus glicoproteínas son descargadas en el espacio perivitelino, evitando así la polispermia y la entrada de patógenos. Durante la fase inicial del crecimiento secundario del oocito también hay una cierta deposición

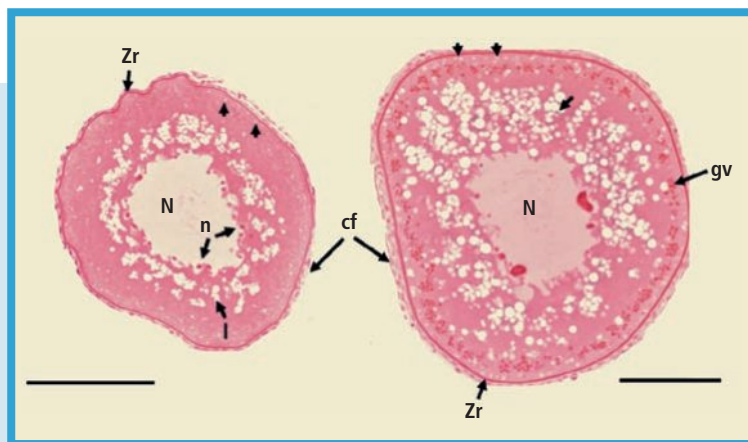


FIGURA 11.

Folículos en segunda fase de crecimiento. El oocito de la izquierda (inicio del crecimiento secundario; previtelogénesis tardía) muestra inclusiones lipídicas (l) en el ooplasma, situadas alrededor del núcleo (N) que posee numerosos nucleolos (n). Así mismo se observan los alvéolos corticales (puntas de flecha), dispuestos en el ooplasma periférico, inmediatamente por debajo de la zona radiata (Zr). El oocito de la derecha, en vitelogénesis temprana, aparte de las inclusiones lipídicas y alvéolos corticales muestra la presencia de gránulos de vitelo (gv), distribuidos a modo de corona en el ooplasma periférico. Así mismo, muestra una zona radiata mucho más engrosada. Se observa como ambos oocitos están rodeados por las correspondientes capas foliculares. Barra 100 μ m.

de lípidos, aunque limitada (Fig. 11 izquierda). Recientemente, se ha demostrado la presencia de transcritos de lipoproteinlipasa (una enzima que se piensa tiene un papel importante en proveer de ácidos grasos al oocito) en oocitos de lubina en previtelogénesis tardía (Ibañez *et al.*, 2008). Por tanto, al inicio del crecimiento secundario, el oocito posee todas las estructuras y moléculas citoplasmáticas precisas para llevar a cabo con éxito la segunda etapa del crecimiento secundario o vitelogénesis. Finalmente, al final de la previtelogénesis también se observan cambios estructurales en la periferia del folículo ovárico (Fig. 10 y 11 izquierda). El corion o zona radiata (ZR) empieza a depositarse en la periferia del oocito y a medida que esta se engrosa, las microvellosidades (Fig 12), que conforman una conexión íntima entre el oocito y las células foliculares,



se alargan para mantener el contacto con las células de la granulosa, vía pequeños canales que atraviesan el corion (zona radiata).

La información acerca del control hormonal de la primera fase de crecimiento es escasísima, pero hay unos pocos estudios que demuestran que el E_2 regula las divisiones mitóticas de las oogonias y que la 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-ona (DHP) estaría relacionada con el inicio de las divisiones meióticas (Miura *et al.*, 2007). También se ha sugerido que la 11KT podría desempeñar un papel importante en la deposición de lípidos en oocitos en crecimiento primario de *Anguilla australis* y que determinadas hormonas del eje metabólico podrían participar en la regulación de esta fase de crecimiento (Lokman *et al.*, 2007). Pero en realidad, las evidencias aceptables acerca del control hormonal de la fase de crecimiento primario del folículo son muy escasas. Por su parte el crecimiento tardío del folículo en previtelogénesis, o inicio del crecimiento secundario, se piensa que está regulado por las gonadotrofinas. Específicamente, se sabe que la producción de la formación de la envoltura vitelina esta controlada por el estradiol y este a su vez, es producido por el folículo bajo la acción de las gonadotrofinas principalmente por la FSH (Patiño and Sullivan, 2002).

2.4.6. La vitelogénesis y su control endocrino

El almacenaje de cantidades importantes de vitelo es una manera muy eficiente de proveer los elementos necesarios para el mantenimiento del desarrollo embrionario y larvario. En los peces la incorporación de vitelo dentro del oocito es un proceso extremadamente importante para que la reproducción tenga lugar con éxito y de una extraordinaria trascendencia en las especies cultivadas por su estrecha relación con las características productivas de la progenie. Al proceso de la incorporación del vitelo se le conoce como vitelogénesis y esta acompañado por un crecimiento importante del oocito debido a la incorporación, desde el plasma, de las proteínas precursoras del vitelo, principalmente vitelogenina (Vtg) y posiblemente también lipoproteínas de muy baja densidad (Babin *et al.*, 2007).

En la Figura 12 se muestra un diagrama que resume, de forma esquemática, el control hormonal de la vitelogenesis para una mejor comprensión de este proceso. La Vtg es una fosfoglico-proteína muy grande y compleja que liga calcio y que se sintetiza en el hígado bajo

la estimulación del E_2 . A su vez, la producción de este por parte del folículo es inducida por niveles crecientes de FSH plasmática (Patiño y Sullivan, 2002). En la lubina se ha demostrado, recientemente, que la FSH homóloga estimula la liberación de E_2 por fragmentos de ovario de manera dosis y tiempo dependiente. Además, esta estimulación es

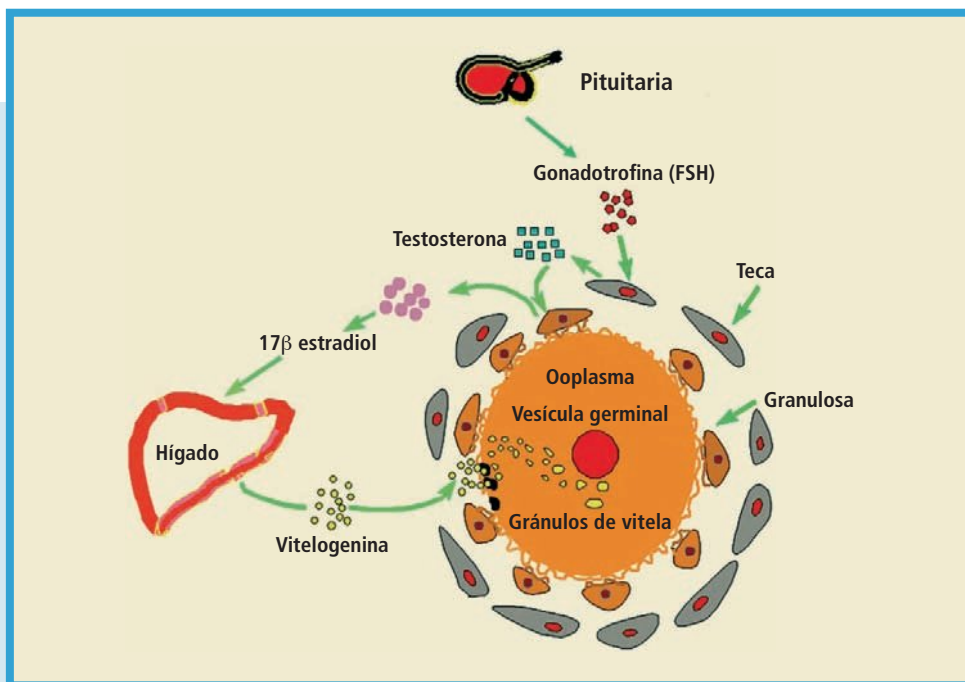


FIGURA 12.

Control hormonal de la vitelogenénesis. La FSH hipofisaria actúa sobre sus receptores específicos en las células foliculares provocando la secreción de 17β estradiol. Este, a su vez, actúa sobre el hígado induciendo la síntesis de vitelogenina que es transportada, por la sangre, hacia el folículo e incorporada por el oocito mediante receptores específicos situados en la superficie del mismo. En los salmónidos la síntesis de 17β estradiol es consecuencia de la cooperación entre la teca y la granulosa. La FSH actúa sobre las dos capas foliculares estimulando la producción de Testosterona (T) por parte de la teca y su difusión y aromatización a 17β estradiol en la granulosa. En teleósteos no salmónidos, las pocas evidencias existentes indican que la síntesis de esteroides foliculares la realizan las células de la granulosa (Nagahama *et al.*, 1993). La formación del corion (zona radiata o envoltura vitelina) tiene lugar durante la vitelogenénesis y también esta regulada por el 17β estradiol. (Modificado de Nagahama *et al.*, 1995).



mas elevada en hembras que se encuentran en vitelogenesis temprana y media (Molés *et al.*, 2008) y coincide con niveles altos de expresión del FSHR en los folículos ováricos (Rocha *et al.*, 2009). También se ha demostrado que este papel es específico puesto que la FSH estimula la actividad aromatasa (citocromo P450; responsable de la conversión de la T en E₂) de folículos ováricos de la trucha común *in vitro* (Montserrat *et al.*, 2004). Además, la FSH parece estimular la incorporación de Vtg dentro de los oocitos de la trucha arcoiris (Jalabert, 2005). Por regla general a la FSH se le ha sugerido un papel predominante durante la oogénesis temprana (vitelogénesis) en peces que poseen un tipo de desarrollo ovárico sincrónico (una sola puesta). Sin embargo, en especies que ponen varias veces (desarrollo ovárico sincrónico por grupos y asincrónico) el papel de la FSH es menos claro y también se le ha atribuido una posible función a la LH. En parte, porque se han observado fluctuaciones paralelas de las subunidades β FSH y β LH de manera concomitante al desarrollo folicular de estas especies (Rosenfeld *et al.*, 2007) y en parte, porque el control gonadotropo de la vitelogenesis es parcialmente dependiente de la producción de E₂ por el folículo y se sabe que tanto la LH como la FSH son capaces de estimular su síntesis *in vitro*. Además del control gonadotropo, se ha sugerido, en varias especies de teleósteos, que en la incorporación de Vtg por parte de los folículos en crecimiento podrían cooperar otras hormonas y factores paracrinos (revisiones de Jalabert, 2005; Hiramatsu, *et al.*, 2006; Polzonetti-Magni *et al.*, 2004). La Vtg es secuestrada de la circulación, selectivamente por los oocitos, vía receptores específicos de vitelogenina (VtgRs) mediante pinocitosis (Fig. 13). A continuación es agrupada (empaquetada) en pequeñas vesículas recubiertas de clatrina quienes luego, al fusionarse, darán lugar a vesículas más grandes que se mueven desde la periferia hacia el oolema periférico. Las vesículas se fusionan con lisosomas dando lugar a la formación de los cuerpos multivesiculares (MVB), de mucho mayor tamaño, que gradualmente se transforman en gránulos de vitelo quienes, a su vez, dan lugar a los grandes glóbulos de vitelo (Le Menn *et al.*, 2007). Los MVB contienen enzimas lisosomales, tales como la catepsina D que rompe la Vtg en los diferentes polipéptidos derivados del vitelo. La participación de esta enzima y hasta cierto punto otra proteasa, la catepsina B, en el procesado

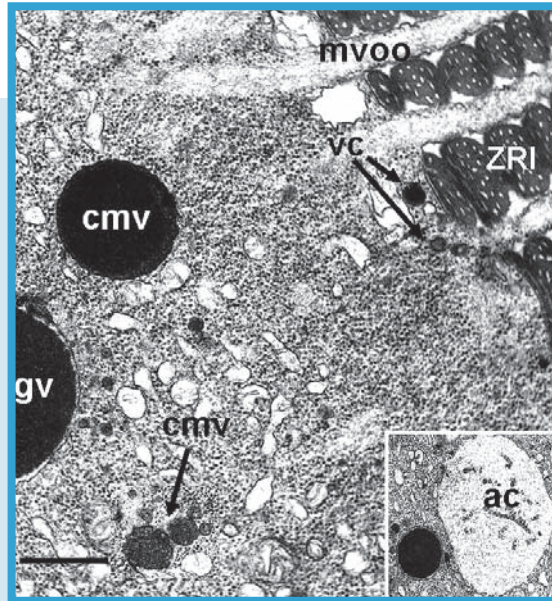


FIGURA 13.

Microfotografía al electrónico mostrando la incorporación de vitelogenina en un oocito de lubina en vitelogénesis. La vitelogenina es secuestrada de la circulación a través de receptores de membrana específicos y empaquetada en pequeñas vesículas recubiertas de clatrina (vc). Estas se fusionan entre si y dan lugar a otras mas grandes para formar los cuerpos multivesiculares (cmv) que gradualmente se transforman en gránulos de vitelo (gv). Se observan también las microvellosidades (mvo) emitidas por el oocito que atraviesan la zona radiada (o corion) (ZRI) para ponerse en contacto con las células foliculares. En el inserto se muestra un alveolo cortical (ac). Barra 1μ.

de la Vtg se ha observado tanto en peces marinos como dulceacuícolas (Cerdá *et al.*, 2007 y Cerdá este volumen Capítulo VII).

Como en otros vertebrados, el precursor de la molécula completa de Vtg de los teleósteos consiste, empezando por el extremo terminal, en un péptido señal, una cadena de lipovitelina pesada (LvH), la fosvitina (Pv), una cadena ligera de lipovitelina (LvL) y un factor von Willebrand con dominio tipo D (Vwfd) que en los teleósteos se divide en dos, el componente beta (β -c) y la región codificadora C-terminal [NH₂-(LvH-Pv-LvL-beta'-CT)-COO-]. Una vez ensambladas las Vtgs son



glicosiladas y fosforiladas post-traducción y secretadas como dímeros en el plasma (Finn, 2007).

Hasta mediados de 90, en los teleósteos, solo se había identificado un tipo de vitelogenina, pero actualmente se han evidenciado múltiples genes de Vtg en varias especies (Hiramatsu *et al.*, 2002, 2006, Sawaguchi *et al.*, 2006, Finn 2007). Es más, se observó que existían un importante número de genes de Vtg en la trucha y en el pez cebra. En la primera especie, la identidad de los diferentes genes que codificaban Vtg era muy alta y por tanto, los productos de la traducción probablemente eran muy similares (Hiramatsu *et al.*, 2006). No obstante, entre los genes de vitelogenina del pez cebra (*Danio rerio*), se vio que existía una nueva vitelogenina caracterizada por la pérdida del dominio fosvitina. A esta nueva forma de vitelogenina (PvIVtg; NH₂-LvH-LvL-COOH) se la denominó como «incompleta» y también se identificó en dos especies de tilapia. Recientemente se han identificado tres formas de vitelogenina [VtgA, VtgB and VtgC (PvIVtg)] en la lubina blanca (*Morone americana*), gobio extranjero (*Acanthogobius flavimanus*), gambusino (*Gambusia affinis*), *Sebastes taczanowskii*, fúndulo (*Fundulus heteroclitus*), dorada japonesa (*Pagrus major*) y lisa común (*Mugil cephalus*) (Hiramatsu *et al.*, 2006; Sawaguchi *et al.* 2006; Amano *et al.*, 2008). En general se cree que los teleósteos de los superórdenes Paracanthopterigii y Acanthopterigi expresan dos vitelogeninas VtgA y VtgB y además parece que la VtgC estaría ampliamente representada entre los Teleósteos (Matsubara *et al.*, 2003, Finn and Kristoffersen, 2007).

Igual que en otros organismos ovíparos, en los teleósteos la fragmentación enzimática de la vitelogenina da lugar a la típica serie de proteínas del vitelo que incluyen la lipovitelina (Lv), la fosvitina (Pv) y el componente b (β' -c). La Lv es una proteína del vitelo con un alto contenido en lípidos formada por dos polipéptidos, una cadena de Lv pesada (LvH) y una de Lv ligera (LvL). La Pv es una proteína pequeña en la cual más de la mitad de los residuos aminoácidos poseen dominios poliserina, altamente fosforilados, que confieren a la vitelogenina su alta afinidad para ligar calcio. El β' -c es la tercera proteína del vitelo y no contiene ni fósforo ni lípidos (Hiramatsu *et al.* 2002, 2006). Se piensa que la Lv es una proteína del vitelo que básicamente sirve como fuente nutritiva de aminoácidos y lípidos para el embrión en desarrollo; mientras que la Pv provee de los



minerales necesarios para el desarrollo del esqueleto y de las funciones metabólicas. Todavía no se conocen las funciones fisiológicas o nutritivas del β -c o del péptido C-terminal (Hiramatsu *et al.*, 2006).

Como hemos explicado antes, la acumulación de las proteínas del vitelo y de los mRNAs (RNA mensajeros) necesarios para el desarrollo embrionario y otras funciones, tiene lugar en la profase I del ciclo mitótico. Después del crecimiento del oocito (vitelogénesis), el cambio en la estimulación hormonal permite que el oocito reanude la meiosis y proceda a la metafase II o maduración final del oocito (FOM). En esta fase la meiosis se detiene nuevamente; se reactiva después de que la FOM tenga lugar y se completa en el momento de la fertilización. El proceso de maduración tiene lugar como consecuencia de un cambio hormonal propiciado por la LH bajo cuya acción, el folículo sintetiza y secreta la hormona inductora de la maduración (MIH) que en los salmónidos y algunas especies de agua dulce es una progestina, el 17,20 β -dihidroxi-4pregnen-3ona (17, 20 β P; DHP). En varias especies marinas se ha identificado otra progestina, derivada de la DHP, como MIH: el 17 α , 20 β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 β S) (Jalabert 2005; Suwa and Yamashita, 2007). El control molecular y hormonal de la maduración, así como el procesado de las proteínas del vitelo durante la maduración y su papel en los procesos de hidratación del oocito, se describe detalladamente en este volumen por lo que aquí no nos extenderemos más en ello (ver J.Cerdá este mismo volumen, capítulo VII).

AGRADECIMIENTOS

Los datos originales aquí mencionados fueron obtenidos a través de las siguientes ayudas: AGL2001-1257, AGL2005-00796 y CSD2007-00002.

BIBLIOGRAFÍA

- AIZEN, J., H. KASUTO, M. GOLAN, H. ZAKAY y B. LEVAVI-SIVAN, 2007 Expression and characterization of biologically active recombinant tilapia FSH: Immunohistochemistry, stimulation by GnRH and effect on steroid secretion. *Biol. Reprod.* 76: 692-700.
- AMANO, H., T. FUJITA, N. HIRAMATSU, H. KAGAWA, T. MATSUBARA, C.V. SULLIVAN y A. HARA, 2008 Multiple vitellogenin-derived yolk proteins in grey mullet (*Mugil*



- cephalus*): disparate proteolytic patterns associated with ovarian follicle maturation. Mol. Reprod. Dev. 75:1307-17.
- AMER, M., T. MIURA, C. MIURA y K. YAMAGUCHI, 2001 Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese huchen, *Hucho perryi*. Biol. Reprod. 65: 057-1066.
- ASCOLI, M., F. FANELLI y D. L. SEGALOFF, 2002 The Lutropin/Choriogonadotropin Receptor, A 2002 Perspective. Endocr. Rev. 23: 141-174.
- ATGER, M., M. MISRAHI, S. SAR, L. LE FLEM, P. DESSEN y E. MILGROM, 1995 Structure of the human luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor gene: unusual promoter and 5' non-coding regions. Mol. Cell. Endocrinol. 111: 113-123.
- BABIN, P.J., O. CARNEVALI, E. LUBZENS y W. J. SCHNEIDER, 2007 Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish, pp 39-76 en The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications, editado por: P. J.Babin, J. Cerdá y E. Lubzens. Springer. The Netherlands.
- BANERJEE, A. y I. A. KHAN, 2007, Molecular cloning of FSH and LH β subunits and their regulation by estrogen in Atlantic croaker. Gen. Comp. Endocrinol. 155: 827-837
- BASU, D. y S. BHATTACHARYA, 2002 Purification of two types of gonadotropin receptors from carp ovarian follicles: overlapping recognition by two different ligands. Gen. Comp. Endocrinol. 129: 152-162.
- BHOWMICK, N., J. HUANG, D. PUETT, N. W. ISAACS, y A. J. LAPHORN, 1996 Determination of residues important in hormone binding to the extracellular domain of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor by site-directed mutagenesis and modeling. Mol. Endocrinol. 10: 1147-1159.
- BHOWMICK, N., P. NARAYAN y D. PUETT, 1999 Identification of ionizable amino acid residues on the extracellular domain of the lutropin receptor involved in ligand binding. Endocrinology 140: 4558-4563.
- BIENIARZ, K. y D. E. KIME, 1986 Autoradiographic localization of gonadotrophin receptors in ovaries of the common carp, *Cyprinus carpio* L. Gen. Comp. Endocrinol. 64: 151-156.
- BILLARD, R., 1986 Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. Reprod. Nutr. Dévelop. 26(4): 877-920.
- BLAISE, O., M. SZKUDLINSKI, S. HASSIN, J. STUBBLEFIELD, B. WEINTRAUB y Y. ZOHAR, 1999 Production of recombinant striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotropins in Chinese hamster ovarian (CHO) cell expression system, pp. 482 en Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive physiology of fish editado por: B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson y S.O. Stefansson. Institute of Marine Research and University of Bergen, Bergen, Norway.



- BLUHM, A. P., R. A. TOLEDO, F. M. MESQUITA, M. T. PIMENTA, F. M. FERNANDES, M. T. RIBELA y M. F. LAZARI, 2004 Molecular cloning, sequence analysis and expression of the snake follicle-stimulating hormone receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137: 300-311.
- BOBE, J., T. NGUYEN y B. JALABERT, 2004 Targeted gene expression profiling in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary during maturational competence acquisition and oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 71: 73-82.
- BOGERD, J., E. ANDERSSON, M. BLOMENROHR, C. P. TENSEN, H. H. A. G. VAN DER PUTTEN, H. F. VISCHER, J. C. M. GRANNEMAN, C. JANSSEN-DOMMERHOLT, H. GOOS y R. W. SCHULZ, 1999 Discrepancy between structural characterization and ligand specificity of an African catfish gonadotrofin receptor, pp167-169 en *Proceedings of the Sixth International Symposium on the reproductive physiology of fish*, editado por: B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Anderson y S.O. Stefansson. Institute of Marine Research and University of Bergen, Bergen.
- BOGERD, J., M. BLOMENROHR, E. ANDERSSON, H. H. A. G. VAN DER PUTTEN, C. P. TENSEN, H. F. VISCHER, J. C. M. GRANNEMAN, C. JANSSEN-DOMMERHOLT, H. J. T. GOOS y R. W. SCHULZ, 2001 Discrepancy between molecular structure and ligand selectivity of a testicular follicle-stimulating hormone receptor of the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol. Reprod.* 64: 1633-1643.
- BOIME, I. y D. BEN-MENAHM, 1999 Glycoprotein hormone structure-function and analog design. *Recent Prog. Horm. Res.* 54: 217-288.
- BORRELLI, L., R. DE STASIO, E. PARISI y S. FILOSA, 2001 Molecular cloning, sequence and expression of follicle-stimulating hormone receptor in the lizard *Podarcis sicula*. *Gene* 275: 149-156.
- BRAUN, T., P. R. SCHOFIELD y R. SPRENGEL, 1991 Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO J.* 10: 1885-1890.
- BRETON, B., C. WEIL, B. JALABERT y R. BILLARD, 1972 Activité réciproque des facteurs hypothalamiques de Bélier (*Ovis aries*) et des poissons téléostéens sur la sécrétion in vitro des hormones gonadotropes c-HG et LH respectivement par des hypophyses de Carpe et de Bélier. *C.R. Acad. Sci. (Paris) Sér. III.* 274: 2530-2533.
- BRETON, B., F. LE GAC y E. SAMBRONI, 1986 Gonadotropin hormone (GTH) receptors in the ovary of the brown trout *Salmo trutta* L. in vitro studies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 64: 163-171.
- BOUSFIELD, G.R. W.M. PERRY y D.N. WARD, 1994, Gonadotropins. Chemistry and biosynthesis, pp. 1749-1792 en *The Physiology of Reproduction*, editado por: E. Knobil y J.D. Neill, Raven Press, New York.
- BURZAWA-GERARD, E., 1982 Chemical data on pituitary gonadotropins and their implication to evolution. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 80-91.



- CAMPBELL, B., J. DICKEY, B. BECKMAN, G. YOUNG, A. PIERCE, H. FUKADA y P. SWANSON, 2006 Previtellogenic oocyte growth in salmon: relationships among body growth, plasma insulin-like growth factor-1, estradiol-17beta, follicle-stimulating hormone and expression of ovarian genes for insulin-like growth factors, steroidogenic-acute regulatory protein and receptors for gonadotropins, growth hormone, and somatolactin. *Biol. Reprod.* 75: 34-44.
- CERDÁ, J., M. FABRA y D. RALDÚA, 2007 Physiological and molecular basis of fish oocyte hydration, pp 349-396 en *The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications*, editado por: P. J. Babin, J. Cerdá y E. Lubzens. Springer. The Netherlands.
- CHANG, Y.-S., C.-J. HUANG, F.-L. HUANG y T.-B. LO, 1988 Primary structures of carp gonadotropin subunits deduced from cDNA nucleotide sequences. *Int. J. Pept. Protein Res.* 32 :556-564.
- CHATTERJEE, A., S.T. SHEN y J.Y.L. YU, 2005 Molecular cloning of cDNAs and structural model analysis of two gonadotropin beta-subunits of snakehead fish (*Channa maculata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 143: 278-286.
- CHOI, E.J. D.H. JIN y Y.C. SOHN, 2003 Gonadotropins in the Manchurian trout, *Brachymystax lenok tsinlingensis*. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 89-90.
- CHOI, E. H. KO, J. SHIN, M. KIM y Y. C. SOHN, 2005 Expression of gonadotropin genes in Manchurian trout *Brachymystax lenok* and production of recombinant gonadotropins. *Fisheries Science* 71: 1193-1200.
- CONN, P.M. y W.F. JR. CROWLEY, 1994 Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annu. Rev. Med.* 45: 391-405.
- COPELAND, P. A., y P. THOMAS, 1993 Isolation of gonadotropin subunits and evidence for two gonadotropins in Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 91: 115-125.
- CUI, M., W. LI, W. LIU, K. YANG, Y. PANG y H. LIN, 2007 Production of recombinant orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*) Luteinizing hormone in insect cells by the baculovirus expression system and its biological effect. *Biol. Reprod.* 76: 74-84.
- DAVIS, D., X. LIU y D. L. SEGALOFF, 1995 Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function. *Mol. Endocrinol.* 9: 159-170.
- DAVIS, D. P., T. G. ROZELL, X. LIU y D. L. SEGALOFF, 1997 The six N-linked carbohydrates of the lutropin/choriogonadotropin receptor are not absolutely required for correct folding, cell surface expression, hormone binding, or signal transduction. *Mol. Endocrinol.* 11: 550-562.
- DEGANI, G., D. GOLDBERG, I. TZCHORI, A. HURVITZ, S. Y. DIN y K. JACKSON, 2003 Cloning of European eel (*Anguilla anguilla*) FSH-beta subunit, and expression



- of FSH-beta and LH-beta males and females after sex determination. Fish. Physiol. Biochem.: 283-: 293.
- DEVLIN, R.H. y Y. NAGAHAMA, 2002 Sex determination and sex differentiation in fish. Aquaculture 208, 191-364.
- DIAS, J. A., B. D. COHEN, B. LINDAU-SHEPARD, C. A. NECHAMEN, A. J. PETERSON, y A. SCHMIDT, 2002 Molecular, structural, and cellular biology of follitropin and follitropin receptor, pp.249-322 en Vitamins & Hormones, Academic Press. New York.
- DITTMAN, A. H., L. YAN y P. SWANSON, 1995 Cloning and functional expresión of the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) type II gonadotropin receptor, pp. 307 en Reproductive physiology of fish, editado por: F.W. Goetz y P. Thomas. The University of Texas at Austin , Marine Science Institute, Port Aransas , Texas.
- ELIZUR, A., N. ZMORA, H. ROSENFELD, I. MEIRI, S. HASSIN, H. GORDIN y Y. ZOHAR, 1996 GTH I and GTH II from the gilthead seabream, *Sparus aurata*; isolation and molecular characterization of β -subunit cDNAs. Gen. Comp. Endocrinol. 102: 39-46.
- ELIZUR, A., N. ZMORA, I. MEIRI, H. KASUTO, H. ROSENFELD, M. KOBAYASHI, Y. ZOHAR y Z.YARON, 2000 Gonadotropins from genes to recombinant proteins, pp. 462-465 en Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive physiology of fish, editado por: B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson y S. O. Stefansson. University of Bergen, Bergen, Norway.
- FAN, Q. R. y W. A. HENDRICKSON, 2005 Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. Nature 433: 269-277.
- FEDOROV, A., L. FEDOROVA, V. STARSHENKO, V. FILATOV y E. GRIGOR'EV, 1998 Influence of exon duplication on intron and exon phase distribution. J. Mol. Evol. 46: 263-271.
- FIDDES, J.C. y K. TALMADGE, 1984 Structure, expression, and evolution of the genes encoding the human glycoprotein hormones. Rec.Prog. Horm.Res. 40: 43-78.
- FINN, R. N., 2007 The maturational diassembly and diferencial proteolysis of paralogues vitellogenins in a marine pelagophil teleost: A conserved mechanism of oocyte hydration. Biol. Reprod. 76: 936-948.
- FINN, R. N. y B. A. KRISTOFFERSEN, 2007 Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the «3R hypothesis»: Correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of teleosts. PLoS ONE. 2(1): e169.
- GARCÍA-HERNANDEZ, M. P., Y. KOIDE, M. V. DIAZ y H. KAWAUCHI, 1997 Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* (Risso, 1980). Gen. Comp. Endocrinol. 106: 389-399.



- GARCÍA-LÓPEZ, A., J. BOGERD, J. C. M. GRANNEMAN, W. van DIJK, J. M. TRANT, G. L. TARANGER y R. W. SCHULZ, 2009 Leydig cells express follicle stimulating hormone receptors in African catfish. *Endocrinology* 150: 357-365.
- GEN, K., O. MARUYAMA, T. KATO, K. TOMIZAWA, K. WAKABAYASHI y Y. KATO, 1993 Molecular cloning of cDNAs encoding two types of gonadotropin α subunits from the masu salmon, *Oncorhynchus masou*. Construction of specific oligonucleotides for α 1 and α 2 subunits. *J. Mol. Endocrinol.* 11: 265-273.
- GEN, K., K. OKUZAWA, B. SENTHILKUMARAN, H. TANAKA, S. MORYAMA y H. KAGAWA, 2000 Unique expression of gonadotropin-I and -II subunit genes in male and female red seabream (*Pagrus major*) during sexual maturation. *Biol. Reprod.* 63: 308-319.
- GOMEZ, J. M., C. WEIL, M. OLLITRAULT, P.Y. LE BAIL, B. BRETON y F. LE GAC, 1999 Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 413-428.
- GOVOROUN M. S., J. C. HUET, J. C. PERNOLLET y B. BRETON, 1997 Use of immobilized metal ion affinity chromatography and dye-ligand chromatography for the separation and purification of rainbow trout pituitary gonadotropins, GTH I and GTH II. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 698(1-2): 35-46.
- GROMOLL, J., E. PEKEL y E. NIESCHLAG, 1996 The Structure and organization of the human follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) Gene. *Genomics* 35: 308-311.
- GUDERMANN, T., B. NURNBERG y G. SCHULTZ, 1995 Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J. Mol. Med.* 73: 51-63.
- GUR, G., H. ROSENFELD, P. MELAMED, I. MEIRI, A. ELIZUR y Z. YARON, 2001 Tilapia glycoprotein hormone α subunit: cDNA cloning and hypothalamic regulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 182: 49-60.
- HAIGIS, M. C., E. S. HAAG y R. T. RAINES, 2002 Evolution of ribonuclease inhibitor by exon duplication. *Mol. Biol. Evol.* 19: 959-963.
- HALM, S., G. MARTÍNEZ- RODRÍGUEZ, L. RODRÍGUEZ, F. PRAT, C. C. MYLONAS, M. CARRILLO y S. ZANUY, 2004 Cloning, characterisation, and expression of three oestrogen receptors (ER α , ER β 1 and ER β 2) in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Mol. Cel. Endocrinol.* 223: 63-75.
- HALM S., A. ROCHA, T. MIURA, F. PRAT y S. ZANUY, 2007 Anti-Müllerian hormone (AMH/AMH) in the European sea bass: Its gene structure, regulatory elements, and the expression of alternatively-spliced isoforms. *Gene* 388: 148-158.
- HASSIN, S., A. ELIZUR y Y. ZOHAR, 1995 Molecular cloning and sequence analysis of striped bass (*Morone saxatilis*) gonadotropins I and II subunits. *J. Mol. Endocrinol.* 15: 23-35.



- HEARN, M. T. W. y P. T. GOMME, 2000 Molecular architecture and biorecognition processes of the cystine knot protein superfamily: part I. The glycoprotein hormones. *J. Mol. Recognit.* 13: 223-278.
- HELLQVIST, A., C. BORNESTAF, B. BORG y M. SCHMITZ, 2004 Cloning and sequencing of the FSH-beta and LH beta-subunit in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, and effects of photoperiod and temperature on LH-beta and FSH-beta mRNA expresión. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135: 167-174.
- HELLQVIST, A., M. SCHMITZ, I. MAYER y B. BORG, 2006 Seasonal changes in expression of LH β and FSH- β in male and female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* *Gen. Comp. Endocrinol.* 145: 263-269
- HEW, C.L., K.Y. TRINH, S.J. DU, y S. SONG, 1989 Molecular cloning and expression of salmon pituitary hormones. *Fish Physiol. Biochem.* 7: 375-380.
- HIRAMATSU, N., T. MATSUBARA, A. HARA, D. M. DONATO, K. HIRAMATSU, N.D. DENSLOW y C.V.SULLIVAN, 2002 Identification, purification and classification of multiple forms of vitellogenin from white perch (*Morone americana*). *Fish Physiol. Biochem.* 26: 355-370.
- HIRAMATSU, N., T. MATSUBARA, T. FUJITA, C.V. SULLIVAN y A. HARA, 2006 Multiple piscine vitellogenin: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments. *Marine Biol.* 149: 35-47.
- HUANG, C.J., F.L. HUANG, G.D. CHANG, Y.S. CHANG, C.F. LO, M.J. FRASER y T.B. LO, 1991 Expression of two forms of carp gonadotropin α subunit in insect cells by recombinant baculovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 7486-7490.
- HURVITZ, A., G. DEGANI, D. GOLDBERG, S.Y. DIN, K. JACKSON y B. LEVAVI-SIVAN, 2005 Cloning of FSH beta, LH beta, and glycoprotein alpha subunits from the Russian Sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*), beta-subunit mRNA expression, gonad development, and steroid levels in immature fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 140: 61-73.
- IBÁÑEZ, A.J. J. PEINADO-ONSURBE, E. SÁNCHEZ, J.M. CERDÁ-REVERTER y F. PRAT, 2008 Lipoprotein lipase (LPL) is highly expressed and active in the ovary of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), during gonadal development. *Comp. Biochem. Physiol., Part A* 150: 347-354.
- IDLER, D. R. y T. B. NG, 1983 Teleost gonadotropins: Isolation, biochemistry and function, pp 187-221 Vol. IXa en *Fish physiology*, editado por W.S.Hoar, D.J. Randall y E.M. Donaldson., Academic Press. New York.
- JACKSON, K., D. GOLDBERG, M. OFIR, M. ABRAHAM y G. DEGANI, 1999 Blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) gonadotropic β subunits (I and II) cDNA sequences and expression during oogenesis. *J. Mol. Endocrinol.* 23: 177-187.



- JALABERT, B., 2005 Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod. Nutrit. Develop.* 45: 261-279.
- JIANG, X., M. DREANO, D. R. BUCKLER, S. CHENG, A. YTHIER, H. WU, W. A. HENDRICKSON y N. EL TAYAR, 1995 Structural predictions for the ligand-binding region of glycoprotein hormone receptors and the nature of hormone-receptor interactions. *Structure* 3: 1341-1353.
- KAGAWA, H., H. TANAKA, K. OKUZAWA y M. KOBAYASHI, 1998 GTH II but not GTH I induces final oocyte maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 80-88.
- KAGAWA, H., K. GEN, K. OKUZAWA y H. TANAKA, 2003 Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*. *Biol. Reprod.* 68: 1562-1568.
- KAH, O., I. ANGLADE, E. LEPRÉTRE, P. DUBOURG y D. MONBRISON, 1993 The reproductive brain in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 11:85-98.
- KAH, O., C. LETHIMONIER, G. SOMOZA, L. G. GUILGUR, C. VAILLANT y J. J. LAREYRE, 2007 GnRH and GnRH receptors in metazoa: A historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153: 346-364.
- KAJAVIA, A. V., G. VASSART y S. J. WODAK, 1995 Modeling of the three-dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats. *Structure* 3: 867-877.
- KAJIMURA, S., Y. YOSHIURA, M. SUZUKI y K. AIDA, 2001a cDNA cloning of two gonadotropin β subunits (GTH-I β and II β) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 122: 117-129.
- KAJIMURA, S., Y. YOSHIURA, M. SUZUKI, T. UTOH, N. HORIE, H. OKA y K. AIDA, 2001b Changes in the levels of mRNA coding for gonadotropin I β and II β subunits during vitellogenesis in the common Japanese conger *Conger myriaster*. *Fish. Sci.* 67: 1053-1062.
- KAMEI, H., T. OHIRA, Y. YOSHIURA, N. UCHIDA, H. NAGASAWA y K. AIDA, 2003 Expression of a biologically active recombinant follicle stimulating hormone of Japanese eel, *Anguilla japonica*, using methylotropic yeast, *Pichia pastoris*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134: 244-254.
- KAMEI, H., I. KAWAZOE, T. KANEKO y K. AIDA, 2005 Purification of follicle-stimulating hormone from immature Japanese eel, *Anguilla japonica*, and its biochemical properties and steroidogenic activities. *Gen. Comp. Endocrinol.* 143(3): 257-66.
- KAMEI, H., T. KANEKO y K. AIDA, 2006 In vivo gonadotropic effects of recombinant Japanese eel follicle-stimulating hormone. *Aquaculture* 261: 771-775.



- KANAMORI, A., H. KAGAWA y Y. NAGAHAMA, 1987 Gonadotropin receptors in the postovulatory ovary of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). Gen. Comp. Endocrinol. 66: 210-217.
- KANAMORI, A. y Y. NAGAHAMA, 1988 Developmental changes in the properties of gonadotropin receptors in the ovarian follicles of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) during oogenesis. Gen. Comp. Endocrinol. 72: 25-38.
- KASUTO, H. y B. LEVAVI-SIVAN, 2005 Production of biologically active tethered tilapia LH β by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Gen. Comp. Endocrinol. 140: 222-232.
- KATO, Y., K. GEN, O. MARUYAMA, K. TOMIZAWA y T. KATO, 1993 Molecular cloning of cDNAs encoding two gonadotropin β subunits (GTH-I β and II β) from the masu salmon, *Oncorhynchus masou*: Rapid divergence of the GTH-I β gene. J. Mol. Endocrinol. 11: 275-282.
- KAWATE, N. y K. M. MENON, 1994 Palmitoylation of luteinizing hormone/human choriongonadotropin receptors in transfected cells. Abolition of palmitoylation by mutation of Cys-621 and Cys-622 residues in the cytoplasmic tail increases ligand-induced internalization of the receptor. J. Biol. Chem. 269: 30651-30658.
- KAWAUCHI, H., K. SUZUKI, H. ITOH, P. SWANSON, N. NAITO, Y. NAGAHAMA, M. NOZAKI, Y. NAKAI y S. ITOH, 1989 The duality of teleost gonadotropins. Fish Physiol. Biochem. 7: 29-38.
- KAZETO, Y. M. KOHARA, T. MIURA, C. MIURA, S. YAMAGUCHI, J.M. TRANT, S. ADACHI y K. YAMAUCHI, 2008 Japanese eel Follicle Stimulating Hormone (Fsh) and Luteinizing Hormone (Lh): Production of biologically active recombinant Fsh and Lh by Drosophila S2 cells and their differential actions on the reproductive biology. Biol. Reprod. 79: 938-946.
- KENE, P. S., R. R. DIGHE y S. D. MAHALE, 2005 Delineation of regions in the extracellular domain of follicle-stimulating hormone receptor involved in hormone binding and signal transduction. Am. J. Reprod. Immunol. 54: 38-48.
- KIM, D.J., Y.C. CHO y Y. C. SOHN, 2005 Molecular characterization of rockfish (*Sebastes schlegelii*) gonadotropin subunits and their mRNA expression profiles during oogenesis. Gen. Comp. Endocrinol. 141: 282-290.
- KING, J. A. y R. P. MILLARD, 1992 Evolution of gonadotropin-releasing hormones. TEM 3: 339-346.
- KO, H., W. PARK, D.-J. KIM, M. KOBAYASHI y Y. C. SOHN, 2007 Biological activities of recombinant Manchurian trout FSH and LH: their receptor specificity, steroidogenic and vitellogenic potencies. J. Mol. Endocrinol. 38: 99-111.
- KOBAYASHI, M., T. MORITA, K. IKEGUCHI, G. YOSHIZAKI, T. SUZUKI y S. WATABE, 2003 Production of recombinant goldfish gonadotropins by baculovirus in silkworm larvae. Fish Physiol. Biochem. 28: 469-471.



- KOBAYASHI, M., T. MORITA, K. IKEGUCHI, G. YOSHIZAKI, T. SUZUKI y S. WATABE, 2006 In vivo biological activity of recombinant goldfish gonadotropins produced by baculovirus in silkworm larvae. *Aquaculture* 256: 433-442.
- KOBE, B. y A. V. KAJAVA, 2001 The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 725-732.
- KOIDE, Y., H. ITOH y H. KAWAUCHI, 1993 Isolation and characterization of two distinct gonadotropins, GTHI and GTHII, from bonito (*Katsuwonus pelamis*) pituitary glands. *Int. J. Peptide Prot. Res.* 41: 52-65.
- KUMAR, R. S., S. IJIRI y J. M. TRANT, 2001a Molecular biology of the channel catfish gonadotropin receptors: 2. complementary DNA cloning, functional expression, and seasonal gene expression of the follicle-stimulating hormone Receptor. *Biol. Reprod.* 65: 710-717.
- KUMAR, R. S., I. SHIGEO y J. M. TRANT, 2001b Molecular biology of channel catfish gonadotropin receptors: 1. cloning of a functional luteinizing hormone receptor and preovulatory induction of gene expression. *Biol. Reprod.* 64: 1010-1018.
- KUMAR, R. S. y J. M. TRANT, 2004 Hypophyseal gene expression profiles of FSH-[beta], LH-[beta], and glycoprotein hormone-[alpha] subunits in *Ictalurus punctatus* throughout a reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 136: 82-89.
- KUSAKABE, M., I. NAKAMURA, J. EVANS, P. SWANSON y G. YOUNG, 2006 Changes in mRNAs encoding steroidogenic acute regulatory protein, steroidogenic enzymes and receptors for gonadotropins during spermatogenesis in rainbow trout testes. *J. Endocrinol.* 189: 541-554.
- KWOK, H. F., W. K. SO, Y. WANG y W. GE, 2005 Zebrafish Gonadotropins and their receptors: I. Cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors. Evidence for their distinct functions in follicle development. *Biol. Reprod.* 72: 1370-1381.
- LAAN, M., H. RICHMOND, C. HE y R. K. CAMPBELL, 2002 Zebrafish as a model for vertebrate reproduction: characterization of the first functional zebrafish (*Danio rerio*) gonadotropin receptor. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125: 349-364.
- LE MENN, F., J. CERDÁ y P. BABIN, 2007 Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles, pp: 1-37 en *The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications*, editado por: P. J. Babin, J. Cerdá y E. Lubzens. Springer. The Netherlands.
- LETHIMONIER, C., T. MADIGOU, J. A. MUÑOZ-CUETO, J. J. LAREYRE y O. KAH, 2004 Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135: 1-16.



- LEUNG, M.Y.-K., P.J. STEINBACH, P.J. BEAR, D. BAXENDALE, P.Y. FECHNER, O.M. RENNERT y W.Y. CHAN, 2006 Biological effect of a novel mutation in the third leucine-rich repeat of human luteinizing hormone receptor. *Mol. Endocrinol.* 20: 2493-2503.
- LI, M.D. y J.J. FORD, 1998 A comprehensive evolutionary analysis based on nucleotide and amino acid sequences of the α - and β -subunits of glycoprotein hormone gene family. *J. Endocrinol.* 156: 529-542.
- LI, H., V. PAPADOPOULOS, M. VIDIC, M. DYM y M. CULTY, 1997 Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol: identification of signaling mechanisms involved. *Endocrinology* 138: 1289-1298.
- LIN, Y.-W. P., B. A. RUPNOW, D. A. PRICE, R. M. GREENBERG y R. A. WALLACE, 1992 *Fundulus heteroclitus* gonadotropins. III. Cloning and sequencing of gonadotropic hormone (GTH) I and II β -subunits using the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 85: 127-139.
- LIU, Z.J., S. KIM y A. KARSİ, 2001 Channel catfish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: Complementary DNA cloning and expression during ovulation. *Mar. Biotechnol.* 3(6): 90-99.
- LOKMAN, P.M., K.A. GEORGE, S.L. DIVERS, M. ALGIE y G. YOUNG, 2007 11-Ketotestosterone and IGF-1 increase the size of previtellogenic oocytes from short-finned eel, *Anguilla australis*, *in vitro*. *Reproduction* 133: 955-967.
- LOIR, M., 1999 Spermatogonia of rainbow trout: II. In vitro study on the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. *Mol. Reprod. Dev.* 53: 434-442.
- LOOSFELT, H., M. MISRAHI, M. ATGER, R. SALESSE, M. T. VU HAI-LUU THI, A. JOLIVERT, A. GUIOCHON-MANTEL, S. SAR, B. JALLAL y J. GARNIER, 1989 Cloning and sequencing of porcine LH-hCG receptor cDNA: variants lacking transmembrane domain. *Science* 245: 525-528.
- LUCKENBACH, J. A., D. B. ILIEV, F. W. GOETZ y P. SWANSON, 2008 Identification of differentially expressed ovarian genes during primary and early secondary oocyte growth in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6:2. <http://www.rbej.com/content/6/1/2>.
- MAÑANÓS, E.L., P. SWANSON, J. STUBBLEFIELD y Y. ZOHAR, 1997 Purification of Gonadotropin II from a teleost fish, the hybrid striped bass, and development of a specific enzyme-linked immunosorbent assay. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108: 209-222.
- MATEOS, J., E. MAÑANOS, G. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, M. CARRILLO, B. QUÉRAT y S. ZANUY, 2003 Molecular characterization of sea bass gonadotropin subunits (α ,



- FSH β , and LH β) and their expression during the reproductive cycle. Gen. Comp. Endocrinol. 133: 216-232.
- MATEOS, J., E. MAÑANÓS, P. SWANSON, M. CARRILLO y S. ZANUY, 2006 Purification of luteinizing hormone (LH) in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and development of a specific immunoassay. Cien. Mar. 32(2): 271-283.
- MATSUBARA, T., M. NAGAE, N. OKUBO, T. ANDOH, S. SAWAGUCHI, N. HIRAMATSU, C.V. SULLIVAN y A. HARA, 2003 Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts. Fish Physiol. Biochem. 28: 295-299.
- MAUGARS, G. y M. SCHMITZ, 2006 Molecular cloning and characterization of FSH and LH receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Gen. Comp. Endocrinol. 149: 108-117.
- MAZÓN, M.J., A. GÓMEZ, M. CARRILLO y S. ZANUY, 2008 Efecto in vivo de la LHsc o su gen codificante en los niveles plasmáticos de LH y espermiación de la lubina (*Dicentrarchus labrax*), pp. 99-102 en Avances en Endocrinología Comparada, V.IV editado por J.A. Muñoz-Cueto, J.M. Mancera y G. Martínez. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz. Cádiz.
- McFARLAND, K. C., R. SPRENGEL, H. S. PHILLIPS, M. KOHLER, N. ROSEMBLIT, K. NIKOLICS, D. L. SEGALOFF y P. H. SEEBURG, 1989 Lutropin-choriogonadotropin receptor: an unusual member of the G protein-coupled receptor family. Science 245: 494-499.
- MEIRI, I., N. ZMORA y A. ELIZUR, 1999 Functional expression of recombinant seabream FSH and LH in baculovirus infected insect cells, pp. 488 en Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive physiology of fish, editado por B.Norberg, O.S. Kjesbu, G.L.Taranger, E. Andersson y S.O. Stefansson. Institute of Marine Research y University of Bergen, Bergen, Norway.
- MIURA, T., K. YAMAUCHI, H. TAKAHASHI y Y. NAGAHAMA, 1991 Hormonal induction of all stages of spermatogenesis In vitro in the male eel (*Anguilla japonica*). Proc. Nat. Acad. Sci. U S A 88: 5774-5778.
- MIURA, T., C. MIURA, T. OHTA, M.R. NADER, T. TODO y K. YAMAUCHI, 1999 Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. Biochem. Biophys. Res. Comm. 264: 2390-2394.
- MIURA, T., C. MIURA, Y. KONDA y K. YAMAUCHI, 2002 Spermatogenesis-preventing substance in Japanese eel. Development 129: 2689-2697.
- MIURA, T. y C.I. MIURA, 2003 Molecular control of fish spermatogenesis. Fish Physiol. Biochem. 28: 181-186.
- MIURA, T., C.I. MIURA, T. OHTA, y K. YAMAUCHI, 2003 Complementary desoxyribonucleic acid cloning of spermatogonial stem cell renewal factor. Endocrinology 144: 5504-5510.



- MIURA, T. M. HIGUCHI, Y. OZAKI, T. OHTA y C. MIURA, 2006 Progesterin is a factor for the initiation of the meiosis in spermatogenic cells in the eel. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 113: 7333-7338.
- MIURA, C., T. HIGASHINO y T. MIURA, 2007 A Progesterin and an Estrogen Regulate Early Stages of Oogenesis in Fish. *Biol. Reprod.* 77: 822-828
- MIWA, S., L. YAN y P. SWANSON, 1994 Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by in vitro ligand autoradiography. *Biol. Reprod.* 50: 629-642.
- MIZUTANI, T., T. MINEGISHI, Y. NONOBE, Y. ABE, Y. HASEGAWA, K. WAKABAYASHI, M. KAMIYOSHI y K. MIYAMOTO, 1998 Molecular cloning and functional expression of chicken luteinizing hormone receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1397: 1-8.
- MOLÉS, G., A. GÓMEZ, A. ROCHA, M. CARRILLO y S. ZANUY, 2008 Purification and characterization of follicle-stimulating hormone from pituitary glands of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 158: 68-76.
- MONTSERRAT, N., A. GONZÁLEZ, E. MÉNDEZ, F. PIFERRER y J. V. PLANAS, 2004 Effects of follicle stimulating hormone on estradiol-17 β production and P-450 aromatase (CYP19) activity and mRNA expression in brown trout vitellogenic ovarian follicles *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137: 123-131.
- MORITA, T., G. YOSHIZAKI, M. KOBAYASHI y T. TAKEUCHI, 2003 Production of biologically-active recombinant goldfish gonadotropins in transgenic rainbow trout. *Fish Physiol. and Biochem.* 28: 473-474.
- MORITA, T., G. YOSHIZAKI, M. KOBAYASHI, S. WATABE y T. TAKEUCHI, 2004 Fish eggs as bioreactors: the production of bioactive luteinizing hormone in transgenic trout embryos. *Transgenic Res.* 13: 551-557.
- MOYLE, W. R., R. K. CAMPBELL, R. V. MYERS, M. P. BERNARD, Y. HAN y Y. WANG, 1994 Co-evolution of ligand-receptor pairs. *Nature* 368: 251-255.
- MURIACH, B., J.M. CERDÁ-REVERTER, A. GÓMEZ, S. ZANUY y M. CARRILLO, 2008 Molecular characterization and central distribution of the estradiol receptor alpha ($\text{er}\alpha$) In the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Chem. Neuroanat.* 35:33-48.
- NAGAHAMA, Y., Y. MICHIMASU, Y. MASAKANE, S. NORIYOSHI y T. MINORU, 1993 Molecular endocrinology of oocyte growth and maturation in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 11: 3-14.
- NAGAHAMA, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38: 217-229.
- NAGAHAMA, Y., M. YOSHIKUNI, M. YAMASHITA, TOKUMOTO y Y. KATSU, 1995 Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30:103-45.
- NAITO, N., K. SUZUKI, M. NOZAKI, P. SWANSON, H. KAWAUCHI y Y. NAKAI, 1993 Ultrastructural characteristics of two distinct gonadotropes (GTH I- and GTH II-cells) in the pituitary of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.* 11: 241-246.



- NAKAMURA, S., D. KOBAYASHI, Y. AOKI., Y. EBE, J. WITTBRODT y M. TANAKA, 2006 Identification and lineage tracing of two populations of somatic gonadal precursors in the medaka embryos. *Dev. Biol.* 295: 678-688.
- NAKAYAMA, Y., T. YAMAMOTO, Y. OBA, Y. NAGAHAMA y S. ABE, 2000 Molecular cloning, functional characterization, and gene expression of a follicle-stimulating hormone receptor in the testis of newt *Cynops pyrrhogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275: 121-128.
- NAVAS, J.M., E. MAÑANÓS, J. RAMOS, S. ZANUY, M. CARRILLO, M. THRUSH, J. ZOHAR y N.R. BROMAGE, 1998 Effect of dietary lipid composition on vitellogenin, 17β estradiol and gonadotropin plasma levels and spawning performance in captive sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 165: 65-79.
- OBA, Y., T. HIRAI, Y. YOSHIURA, M. YOSHIKUNI, H. KAWAUCHI y Y. NAGAHAMA, 1999a. Cloning, Functional Characterization, and Expression of a Gonadotropin Receptor cDNA in the Ovary and Testis of Amago Salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 584-590.
- OBA, Y., T. HIRAI, Y. YOSHIURA, M. YOSHIKUNI, H. KAWAUCHI y Y. NAGAHAMA, 1999b The Duality of fish gonadotropin receptors: cloning and functional characterization of a second gonadotropin receptor cDNA expressed in the ovary and testis of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265: 366-371.
- OBA, Y., T. HIRAI, Y. YOSHIURA, T. KOBAYASHI y Y. NAGAHAMA, 2001 Fish gonadotropin and thyrotropin receptors: the evolution of glycoprotein hormone receptors in vertebrates. *Comp. Biochem. and Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 129: 441-448.
- OHATA, T., H. MIYAKE, C. MIURA, H. KAMEI, K. AIDA y T. MIURA, 2007 Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biol. Reprod.* 77: 970-977.
- OZAKI, Y., M. HIGUCHI, C. MIURA, S. YAMAGUCHI, Y. TOZAWA y T. MIURA, 2006. Roles of 11β -hydroxysteroid dehydrogenase in fish spermatogenesis. *Endocrinology* 147: 5139-5146.
- OKADA, T., I. KAWAZOE, S. KIMURA, Y. SASAMOTO, K. AIDA y H. KAWAUCHI, 1994 Purification and characterization of gonadotropin I and II from pituitary glands of tuna (*Thunnus obesus*). *Int. J. Pept. Protein Res.* 43: 69-80.
- PATÍÑO, R. y C.V. SULLIVAN, 2002 Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol. Biochem.* 26: 57-70.
- PETER R. E., V. L. TRUDEAU, B. D. SLOLEY, C. PENG y C. S. NAHORNIK, 1991 Actions of the catecholamines, peptides and sex steroids in regulation of gonadotropin-II in the goldfish, pp 30-33 en *Proc. of the Fourth International Symposium on the Reproductive physiology of fish*, editado por A. P. Scott, J. P. Sumpter, D. E. Kime y M. S. Rolfe. University of East Anglia, Norwich. U.K.



- PETERSEN, C. y O. SÖDER, 2006 The sertoli cell- a hormonal target and «super» nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm. Res.* 66: 153-161.
- PIERCE, J. G. y T. F. PARSONS, 1981 Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* 50: 465-495.
- PLANAS, J. V. y P. SWANSON, 1995 Maturation-associated changes in the response of the salmon testis to the steroidogenic actions of gonadotropins, GTH I and GTH II, *in vitro*. *Biol. Reprod.* 52: 697-704.
- PLANAS, J. V., J. ATHOS, F. W. GOETZ y P. SWANSON, 2000 Regulation of ovarian steroidogenesis *in vitro* by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish. *Biol. Reprod.* 62: 1262-1269.
- POLZONETTI-MAGNI, A., G. MOSCONI, L. SOVERCHIA, S. KIKUYAMA y O. CARNAVALLI, 2004 Multihormonal control of vitellogenesis in lower vertebrates. *Internat. Rev. Cytol.* 239: 1-45.
- PRAT, F., J. R. SUMPTER y C. R. TYLER, 1996 Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* 54: 1375-1382.
- QUÉRAT, B., M. MOUMNI, M. JUTISZ, Y. A. FONTAINE y R. COUNIS, 1990a Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for the putative β subunit of type-II gonadotropin from the European eel. *J. Mol. Endocrinol.* 4: 257-264.
- QUÉRAT, B., M. JUTISZ, Y. A. FONTAINE y R. COUNIS, 1990b Cloning and sequence analysis of the cDNA for the pituitary glycoprotein hormone α subunit of the European eel. *J. Mol. Cell. Endocrinol.* 74: 253-259.
- QUÉRAT, B., 1994 Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates, pp. 27-35 en *Perspective in Comparative Endocrinology*, editado por: K. G. Davey, R. E. Peter y S. S. Tobe. National Research Council of Canada. Ottawa.
- QUÉRAT, B., A. SELLOUK y C. SALMON, 2000 Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) β subunits of two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. *Biol. Reprod.* 63: 222-228.
- QUÉRAT, B., C. TONNERRE-DONCARLI, F. GENIES y C. SALMON, 2001 Duality of gonadotropins in gnathostomes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 124: 308-314.
- QUESADA, J., M. T. LOZANO, A. ORTEGA y B. AGUILLEIRO, 1988 Immunocytochemical and ultrastructural characterization of the cell types in the adenohypophysis of *Sparus aurata* L. (Teleost). *Gen. Comp. Endocrinol.* 72: 209-225.
- QUESNEL, H. y B. BRETON, 1993 Solubilization and purification of the gonadotropin (GTH II) receptor from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovaries. *Gen. Comp. Endocrinol.* 91: 272-280.



- RANNIKKO, A, T.L. PENTTILÄ , F.P. ZHANG , J. TOPPARI , M. PARVINEN y I. HUHTANIEMI, 1996. Stage-specific expression of the FSH receptor gene in the prepubertal and adult rat seminiferous epithelium. J. Endocrinol. 151(1): 29-35.
- ROSE, M. P., R. E. GAINES DAS y A. H. BALEN, 2000 Definition and Measurement of Follicle Stimulating Hormone. Endocr. Rev. 21(1): 5-22.
- ROCHA, A., A. GÓMEZ, S. ZANUY y M. CARRILLO, 2007 Molecular characterization of two sea bass gonadotropin receptors: cDNA cloning, expression analysis, and functional activity. Mol. Cell. Endocrinol. 272: 63-76.
- ROCHA, A., S. ZANUY, M. CARRILLO y A. GÓMEZ, 2009 Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass. Gen. Comp. Endocrinol. doi:10.1016/j.ygcen.2009.03.023.
- RODRÍGUEZ, L., I. BEGTASHI, S. ZANUY, M. SHAW y M. CARRILLO, 2001 Changes in plasma levels of reproductive hormones during first sexual maturation in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under artificial day lengths. Aquaculture 202: 235-248.
- ROSENFELD, H., B. LEVAVI-SIVAN, P. MELAMED, Z. YARON y A. ELIZUR, 1997 The GTH β subunits of tilapia: Gene cloning and expression. Fish Physiol. Biochem. 17: 85-92.
- ROSENFELD, H., I. MEIRI y A. ELIZUR, 2007 Gonadotropic regulation of oocyte development, pp 175-202 en The fish oocyte: From basic studies to biotechnological Applications, editado por: P. J.Babin, J. Cerdá y E. Lubzens. Springer. The Netherlands.
- SAMBRONI, E., F. LE GAC, B. BRETON y J. J. LAREYRE, 2007 Functional specificity of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gonadotropin receptors as assayed in a mammalian cell line. J. Endocrinol. 195: 213-228.
- SANTOS, E. M., M. RAND-WEAVER y C. R. TYLER, 2001 Follicle-Stimulating Hormone and Its α and β Subunits in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Purification, Characterization, Development of Specific Radioimmunoassays, and Their Seasonal Plasma and Pituitary Concentrations in Females. Biol. Reprod. 65: 288-294.
- SAWAGUCHI, S., H. KAWAWA, N. OHKUBO, N. HIRAMATSU, C.V. SULLIVAN y T. MATSUBARA, 2006 Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red sea-bream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. Mol. Reprod. Develop. 73: 719-736.
- SCHULZ, R.W. y T. MIURA, 2002 Spermatogenesis and its endocrine regulation. Fish Physiol. Biochem. 26: 43-56.
- SCHULZ, R., S. MENTING, J. BOGERD, L. R. FRANÇA, D. A. R. VILELA y H. P. GODINHO, 2005 Sertoli cell proliferation in the adult testis-Evidence from two species belonging to different orders. Biol. Reprod. 73: 891-898.



- SEKINE, S., A. SAITO, H. ITOH, H. KAWAUCHI y S. ITOH, 1989 Molecular cloning and sequence analysis of chum salmon gonadotropin cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8645-8649.
- SHERWOOD, N. M., D. A. LOVEJOY y I. R. COE, 1993 Origin of nonmammalian gonadotropin-releasing hormones. *Endocrine Rev.* 14: 241-254.
- SHIMIZU, A. y M. YAMASHITA, 2002 Purification of mummichog (*Fundulus heteroclitus*) gonadotropins and their subunits, using an immunochemical assay with antisera raised against synthetic peptides. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125: 79-91.
- So, W. K., H. F. KWOK y W. GE, 2005 Zebrafish gonadotropins and their receptors: ii. cloning and characterization of zebrafish follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone subunits--their spatial-temporal expression patterns and receptor specificity. *Biol. Reprod.* 72: 1382-1396.
- SOHN, Y.C., Y.YOSHIURA, M. KOBAYASHI y K. AIDA, 1999 Seasonal changes in mRNA levels of gonadotropin and thyrotropin subunits in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113: 436-44.
- SONG, J.L. y G. M. WESSEL, 2005 How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. *Differentiation* 73:1-17
- SUZUKI, K., H. KAWAUCHI y Y. NAGAHAMA, 1988a Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 292-301.
- SUZUKI, K., H. KAWAUCHI y Y. NAGAHAMA, 1988b Isolation and characterization of subunits of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 302-306.
- SUZUKI, K., A. KANAMORI, Y. NAGAHAMA y H. KAWAUCHI, 1988d Development of salmon GTH I and GTH II radioimmunoassays. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 459-467.
- SUWA, K. y M., YAMASHITA, 2007. Regulatory mechanisms of oocyte maturation and ovulation. Pp. 323-347 en *The fish oocyte: From basic studies to biotechnological applications*, editado por: P. J.Babin, J. Cerdá y E. Lubzens. Springer. The Netherlands.
- SWANSON, P., 1991 Salmon gonadotropins: Reconciling old and new ideas, pp. 2-7 en *Proc. of the Fourth International Symposium on the Reproductive physiology of fish*, editado por: A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime y M.S. Rolfe. *Fish Symp*, 91. Department of animal and plant sciences University of Sheffield, Sheffield. UK.
- SWANSON, P., K. SUZUKI, H. KAWAUCHI y W. W. DICKHOFF, 1991 Isolation and characterization of two coho salmon gonadotropins, GTH I and GTH II. *Biol. Reprod.* 44: 29-38.



- SWANSON, P., J. T. DICKEY y B. CAMPBELL, 2003 Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish Physiol. Biochem.* 28: 53-59.
- TANAKA, H., H. KAGAWA, K. OKUZAWA y K. HIROSE, 1993 Purification of gonadotropins (pmGTH I and II) from red seabream (*Pagrus major*) and development of homologous radioimmunoassay for pmGTH II. *Fish Physiol. Biochem.* 10: 409-418.
- THOMAS, P., D. BRECKENRIDGE-MILLER y C. DETWEILER, 1997 Binding characteristics and regulation of the 17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 α -S) receptor on testicular and sperm plasma membranes of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Fish Physiol. Biochem.* 17: 109-116.
- THUILLIER, R., Y. WANG y M. CULTY, 2003 Prenatal exposure to estrogenic compounds alters the expression pattern of platelet-derived growth factor receptors α and β in neonatal rat testis: Identification of gonocytes as targets of estrogen exposure. *Biol. Reprod.* 68: 867-880.
- TRUDEAU, V. L., 1997 Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev. Reprod.* 2: 55-68.
- TSAI, H. J. y L. T. YANG, 1995 Cloning and sequencing of the cDNA encoding the gonadotropin II β -subunit of yellowfin porgy (*Acanthopagrus latus*). *J. Fish. Biol.* 46: 501-508.
- TYLER, C.R., J.P. SUMPTER, H. KAWAUCHI y P. SWANSON, 1991 Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 84: 291-299.
- ULLOA-AGUIRRE, A., A. MALDONADO, P. DAMIÁN-MATSUMURA y C. TIMOSI, 2001 Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch. Med. Res.* 32: 520-532.
- VAN DER KRAAK, G., K. SUZUKI, R. E. PETER, H. ITOH y H. KAWAUCHI, 1992 Properties of carp gonadotropin I and gonadotropin II. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85: 217-229.
- VAN OORDT, P. G. W. y J. PEUTE, 1983 The cellular origin of the pituitary gonadotropins in teleosts, pp 137-186 en *Fish Physiology*, editado por (W.S. Hoar, D.J. Randall y E.M. Donaldson. Academic Press, New York.
- VASSART, G., L. PARDO y S. COSTAGLIOLA, 2004 A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors. *Trends Biochem. Sci.* 29: 119-126.
- VISCHER, H. F. y J. BOGERD, 2003 Cloning and functional characterization of a gonadal luteinizing hormone receptor complementary DNA from the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Biol. Reprod.* 68: 262-271.
- VISCHER, H. F., J. C. M. GRANNEMAN, M. H. K. LINSKENS, R. W. SCHULZ y J. BOGERD, 2003 Both recombinant African catfish LH and FSH are able to activate the African catfish FSH receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 31:133-140.



- WELTZIEN, F.A., B. NORBERG y P. SWANSON, 2003 Isolation and characterization of FSH and LH from pituitary glands of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Gen. Comp. Endocrinol. 131(2): 97-105.
- WELTZIEN, F.A., E. ANDERSSON, Ø. ANDERSEN, K. SHALCHIAN-ABRIZI y B. NORBERG, 2004 The brain-pituitary-Gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (*Pleuronectiformes*). Comp. Biochem. Physiol. (A) 137: 447-477.
- WONG, T. T., Y. GOTHILF, N. ZMORA, K. E. KIGHT, I. MEIRI, A. ELIZUR y Y. ZOHAR, 2004 Developmental Expression of Three Forms of Gonadotropin-Releasing Hormone and Ontogeny of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Gilt-head Seabream (*Sparus aurata*). Biol. Reprod. 71: 1026-1035.
- YAN, L., P. SWANSON y W. W. DICKHOFF, 1992 A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). Biol. Reprod. 47: 418-427.
- YARON, Z., G. GUR, P. MELAMED, H. ROSENFELD, A. ELIZUR y B. LEVAVI-SIVAN, 2003 Regulation of fish gonadotropins. Int. Rev. Cytol. 225: 131-185.
- YARON, Z. y B. SIVAN, 2006 Reproduction, pp. 345-388 en Physiology of Fishes, editado por D.H., Evans y J.B. Claibourne. CRC Press, New York (USA).
- YOSHIURA, Y., M. KOBAYASHI, Y. KATO y K. AIDA, 1997 Molecular cloning of cDNAs encoding two gonadotropin β subunits (GTH-I β and -II β) from the goldfish, *Carassius auratus*. Gen. Comp. Endocrinol. 105: 379-389.
- YOSHIURA, Y., H. SUETAKE y K. AIDA, 1999 Duality of gonadotropin in a primitive teleost, Japanese eel (*Anguilla japonica*). Gen. Comp. Endocrinol. 114: 121-131.
- YOU, S., J. T. BRIDGHAM, D. N. FOSTER y A. L. JOHNSON, 1996 Characterization of the chicken follicle-stimulating hormone receptor (cFSH-R) complementary deoxyribonucleic acid, and expression of cFSH-R messenger ribonucleic acid in the ovary. Biol. Reprod. 55: 1055-1062.
- ZANUY, S. y M. CARRILLO, 1987. La reproducción de los teleosteos y su aplicación en acuicultura, pp. 1-131 en Reproducción en acuicultura, editado por J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta. CAICYT. Madrid.
- ZMORA, N., S. KUMAR, Y. KAZETO y J. M. TRANT, 2003 Production of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) recombinant gonadotropins using the S2 Drosophila cell line system. Fish Physiol. Biochem. 28: 475-477.

3

EL CONTROL AMBIENTAL DE LA REPRODUCCIÓN DE LOS PECES CON ESPECIAL REFERENCIA AL CONTROL DEL CICLO SEXUAL, DE LA PUBERTAD Y DE LA PRECOCIDAD



EL CONTROL AMBIENTAL DE LA REPRODUCCIÓN DE LOS PECES CON ESPECIAL REFERENCIA AL CONTROL DEL CICLO SEXUAL, DE LA PUBERTAD Y DE LA PRECOCIDAD

M. Carrillo*, S. Zanuy, M. J. Bayarri

Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (CSIC)

Resumen

La reproducción es un proceso esencial para la perpetuación de las especies, cuyo objetivo es generar gametos viables que permitan la fertilización y soporten la embriogénesis. Esta culmina con la eclosión de los huevos generando larvas y alevines que se desarrollarán hasta adultos cerrando así nuevamente el ciclo reproductor. La reproducción, al ser un proceso cíclico, está integrada básicamente de ritmicidades fisiológicas diarias y anuales que necesitan sincronizarse muy estrechamente con las variaciones periódicas del medio ambiente exterior. De esta forma los organismos hacen coincidir sus puestas con el periodo del año más favorable para la supervivencia de la especie. El estudio de la influencia de estos factores ambientales y muy particularmente del fotoperiodo y la temperatura sobre el proceso reproductor de los teleosteos en general y de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L) en particular, será el objetivo principal de esta revisión. Además, se revisa el estado actual de la regulación hormonal y ambiental de la pubertad de los teleosteos y la importancia que tiene su control para la acuicultura.



Abstract

Reproduction is an essential process for the perpetuation of the species. The main goal of reproduction is to produce viable gametes that can be fertilized to further support the embryogenesis, culminating at hatching to generate larvae and juveniles which finally will be converted into adults that will be able to re-start the reproductive cycle. The cyclic nature of the reproductive events is based on the daily and annual rhythms of reproduction which in turn, are in close synchrony with the periodic environmental factors. This synchrony will allow the organisms to reproduce at the most favourable period of the year which in turn guarantees the surviving of the progeny. The study of these environmental factors and mechanisms that affect the reproductive events in teleost fish will be the main goal of this review and more specifically the photoperiod and temperature. Sea bass, a valuable species for aquaculture will be used as a model fish for these studies. Besides, the state of the art of the hormonal and environmental regulation of puberty in teleost fish will be reviewed, stressing the fundamental and applied aspects for aquaculture.

3.1. INTRODUCCIÓN

Como en el resto de los vertebrados, en los peces la función reproductora es esencial para la perpetuación de las especies y se puede definir como la capacidad de generar un número óptimo de gametos viables que promuevan la fertilización, soporten la embriogénesis y culminen con la eclosión de los huevos que a su vez, generarán la futura progenie. El proceso reproductor está regulado por una numerosa red de señales tanto internas como externas que inciden sobre el eje cerebro-hipófisis-gónada, cuya estructura y control serán objeto de la presente revisión.

Los peces, al ser animales poiquiloterms, muestran adaptaciones fisiológicas muy estrechas con el medio donde viven, exhibiendo ritmos biológicos diarios y estacionales que suelen estar en fase con los factores ambientales que también varían de forma diaria y estacional. Entre estos factores están la luz, la temperatura, los fenómenos gravitacionales, la disponibilidad del alimento, la presencia de predadores, los



compuestos químicos, etc. La plasticidad adaptativa que exhiben los peces con su medio ambiente sólo es posible gracias a la mediación del cerebro que en primer lugar, integra la información que llega desde el exterior y en segundo lugar, la de las señales hormonales que tienen su origen en los órganos periféricos. En respuesta a estas señales periódicas, provenientes tanto del medio externo como interno, el cerebro sintetiza y libera neurohormonas hipofisotropas (que también siguen unos patrones rítmicos bien definidos) que primero controlan la actividad de la glándula hipófisis y a través de ella al resto del sistema endocrino. De esta manera se establece un doble diálogo temporal, primero entre el cerebro y el medio ambiente externo y luego entre el cerebro y el medio ambiente interno del animal. El resultado final de este diálogo es una respuesta fisiológica de carácter periódico que afecta a los ritmos del animal tales como su actividad motora, nutricional y reproductora. En general, la actividad reproductora está restringida a épocas muy concretas del año que suelen ser las más favorables para la supervivencia de la especie. ¿Como integran los peces esta información, proveniente del exterior, para medir el tiempo y sincronizar su actividad reproductora produciendo los gametos en la época más favorable para la supervivencia de la progenie? Este será uno de los aspectos que desarrollaremos en esta revisión. También se presentarán las rutinas y manipulación artificial, más comunes, utilizadas en el control de los ciclos reproductores y su aplicación en acuicultura. Otro de los aspectos importantes que abordaremos será el de la pubertad y su control intentando responder a las siguientes preguntas: ¿Cuáles son los cambios funcionales del eje cerebro-hipófisis-gónada durante la pubertad?; ¿Qué determinantes internos podrían estar implicados en el inicio de la misma?; ¿Cómo se puede controlar artificialmente la pubertad y que beneficios obtendría la industria acuícola?

3.2. ORIGEN DE LAS PERIODICIDADES

3.2.1. Generalidades

La vida en nuestro planeta ha evolucionado bajo la influencia de tres periodicidades ambientales fundamentales: ciclos diarios, ciclos anuales y ciclos lunares. Los primeros se producen como consecuencia de



la rotación de nuestro planeta alrededor de su eje polar, cada 23 horas 56 minutos y 4 segundos, dando la alternancia regular de los días y las noches. Los segundos por la revolución de la tierra alrededor del sol, una vez cada 365,26 días, dando origen a las estaciones consecuencia de los cambios progresivos del ángulo de inclinación del eje polar terrestre con respecto al sol. La tercera por la de la luna alrededor de la tierra cada 29,53 días solares que presenta un retraso de 50 minutos, a su paso por el meridiano terrestre, debido a que su movimiento está dirigido hacia el este. Cada día hay aproximadamente dos mareas bajas y dos altas debidas a la rotación de la tierra sobre su eje y las posiciones relativas del sol y de la luna. Cuando la luna y el sol entran en oposición (luna llena) suman sus fuerzas gravitatorias y se originan las mareas vivas que ocurren cada 14,77 días. Las mareas muertas se suceden durante el cuarto creciente y el último cuarto menguante.

Desde sus inicios en el mar, los seres vivos se han debatido en estos ambientes cíclicos de luz y temperatura impuestos por las periodicidades de los astros. Cuando los seres vivos invadieron los bordes marinos, inducidos por las periodicidades de las mareas y posteriormente conquistaron la tierra, se sumaron otras periodicidades a las antiguas de luz y temperatura, como las lluvias, las inundaciones, la presión atmosférica, etc. Los organismos han tenido que adaptarse a estas variaciones cíclicas medioambientales desarrollando mecanismos bioquímicos, fisiológicos o conductuales, también de naturaleza rítmica, exhibiendo ritmos biológicos con fases de variación diarias, anuales o lunares. Estas periodicidades han constituido el marco ambiental donde ha actuado la selección natural, permitiendo la supervivencia sólo de aquellos organismos que restringían sus actividades biológicas a los períodos más favorables para su supervivencia. Por otro lado, la predicción de las periodicidades físicas permite que los organismos desarrollen una programación anticipada que se convierte en una estrategia viable, favoreciendo a aquellos que poseen programas temporales innatos de reproducción, crecimiento, metabolismo, desarrollo o de comportamiento en general. La ejecución de estos programas innatos se lleva a cabo en una época muy restringida del ciclo externo o del cambio físico que les es más favorable para el desarrollo de sus funciones biológicas. Por ejemplo, la primera alimentación de las larvas



de especies de peces de latitudes medias y altas se produce cuando el fotoperiodo y la temperatura se incrementan en primavera, pero en las áreas tropicales y subtropicales esta se da con la estación de lluvias o con las corrientes oceánicas.

3.2.2. Factores próximos

La gametogénesis, desde su inicio hasta su culminación, supone un crecimiento gonadal muy significativo (en algunas especies de salmónidos hasta un 20-30 % de su peso corporal). Además, a ésta le sigue el desarrollo embrionario hasta la eclosión y el desarrollo larvario hasta la apertura de la boca de las larvas y la reabsorción de la bolsa de vitelo. Todos estos eventos tardan un tiempo considerable en completarse (en algunas especies hasta más de medio año) por lo que parece evidente que la recrudescencia gonadal se inicie con la suficiente antelación (típicamente varios meses) para que la presencia de la larvas o alevines, coincida con situaciones ambientales favorables para su supervivencia. Estas pueden ser, por ejemplo, un clima adecuado, ausencia de depredadores y disponibilidad de nutrientes. Los peces, como ocurre en otros vertebrados de puestas estacionales, dependen de las señales ambientales para sincronizar los eventos reproductores, como la maduración y la puesta, con los cambios de estación. Además en general, se puede asumir que el ajuste de los individuos con su entorno aumenta en la medida que estos son capaces de obtener información sobre la estación venidera con la suficiente antelación. Baker (1983) llamó a estas señales ambientales causas próximas y Thomsom (1950) factores próximos y se definen como aquellos que controlan los ciclos anuales de las especies afectando a sus procesos biológicos. De entre la multitud de factores ambientales existentes que se podrían considerar como próximos y por tanto responsables del cálculo y la medida del tiempo por parte de los animales, el fotoperiodo es el más importante y en general se considera que es el determinante principal de la maduración de la mayoría de las especies de teleósteos cultivadas. Incluso en especies tropicales y subtropicales que parecen estar regidas por la temperatura o el régimen de lluvias, se estima que el fotoperiodo es la señal ambiental más fiable para los ajustes diarios o estacionales de las funciones biológicas, dado que esta señal está libre de ruido ambien-



tal, permanece constante a través de los años y refleja la estacionalidad dependiendo de la estación (fig. 1).

3.2.3. Factores últimos

Aquellas variables ambientales que durante el curso de la evolución, han ejercido una presión de selección para restringir una actividad a un tiempo determinado del año fueron llamadas causas últimas por Baker (1939) y factores últimos por Thomson (1950). Por ejemplo, en

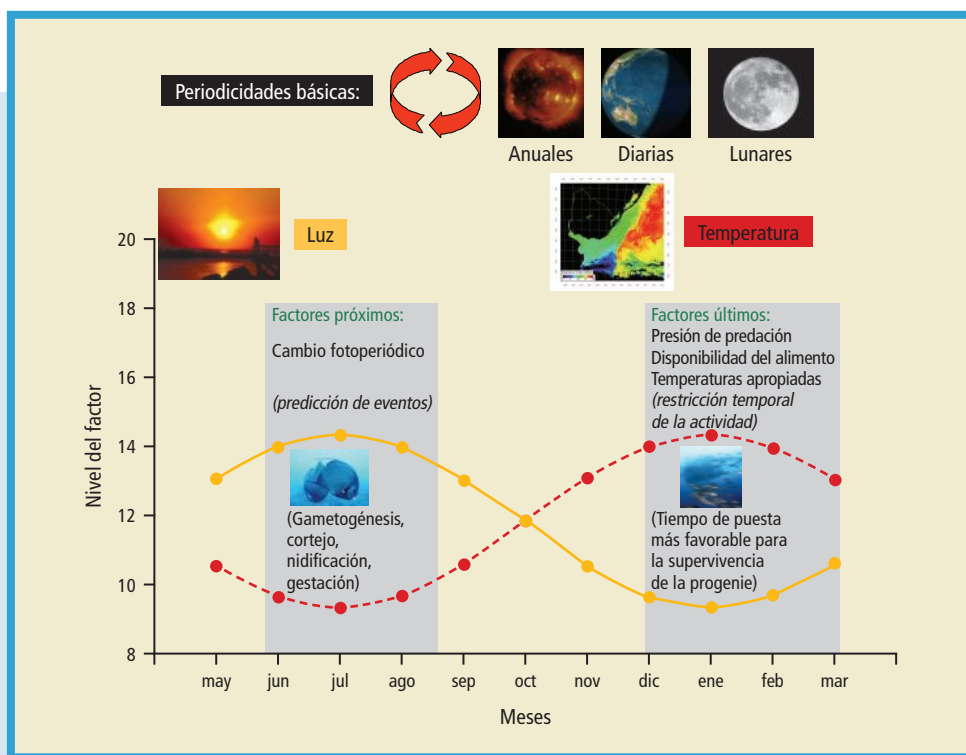


FIGURA 1.

Evolución de los factores ambientales influenciados por las periodicidades anuales, diarias y lunares que permiten predecir eventos reproductores y que están implicados en la regulación del crecimiento gonadal (factores próximos, línea continua) y de los factores que regulan el esfuerzo reproductor de la puesta y que favorecen la supervivencia de la progenie (factores últimos, línea discontinua). Los factores próximos generalmente no coinciden con los últimos y están separados en el tiempo.



algunas especies de peces marinos, la época de puesta está restringida hacia finales de invierno cuando las temperaturas del agua de mar son bajas y en los meses subsiguientes hay alimento abundante para los futuros alevines. La temperatura y la disponibilidad de alimento son consideradas factores últimos, dado que condicionan la época del año en que tiene que reproducirse el animal. Una actividad estacional particular puede estar condicionada por más de un factor último. Por ejemplo, a la temperatura y disponibilidad de alimento pueden sumarse otras como la presencia de predadores, la competencia, etc. De todas maneras, parece ser que el factor último más importante es la disponibilidad de alimento. Además, en todas las especies estudiadas, la estación reproductora coincide con la máxima abundancia del alimento preferido (fig 1).

Las actividades estacionales dirigidas por los factores próximos, no pueden iniciarse a la vez que aquellas controladas por los factores últimos. De manera general, las condiciones (factores últimos) que favorecen la puesta, no favorecen las etapas tempranas de la recrudescencia gonadal (factores próximos). Por tanto, el valor crítico de los factores próximos está bastante separado en el tiempo del valor crítico de los factores últimos y la relación temporal existente entre ellos es característica de una especie determinada y del ecosistema donde habita (fig.1).

3.3. ADAPTACIÓN FISIOLÓGICA A LOS CAMBIOS AMBIENTALES MEDIANTE EL DIÁLOGO ENDOCRINO ENTRE EL MEDIO AMBIENTE EXTERNO E INTERNO DEL ANIMAL

La sucesión de los días y de las noches, de las estaciones del año y de los cambios gravitacionales provocan cambios periódicos de luz, temperatura, lluvias, presión atmosférica, corrientes y mareas, llevando también consigo, la aparición cíclica de nutrientes en el medio natural. Estas periodicidades condicionan la densidad de las poblaciones y la inevitable aparición de depredadores que ejercen una fuerte presión sobre supervivencia de una especie determinada. En conse-

cuencia, estas periodicidades son responsables de la presión de selección sobre aquellos complejos genéticos de los reproductores que determinan la sincronización de sus puestas con las épocas en que las larvas y alevines, encuentran mayor disponibilidad de alimento y las condiciones climáticas y sociales más adecuadas para su supervivencia. La captación eficaz de estas señales ambientales, su correcta interpretación y sobre todo la respuesta fisiológica que desencadenan, son indicadores del grado de adaptación de los animales con su en-

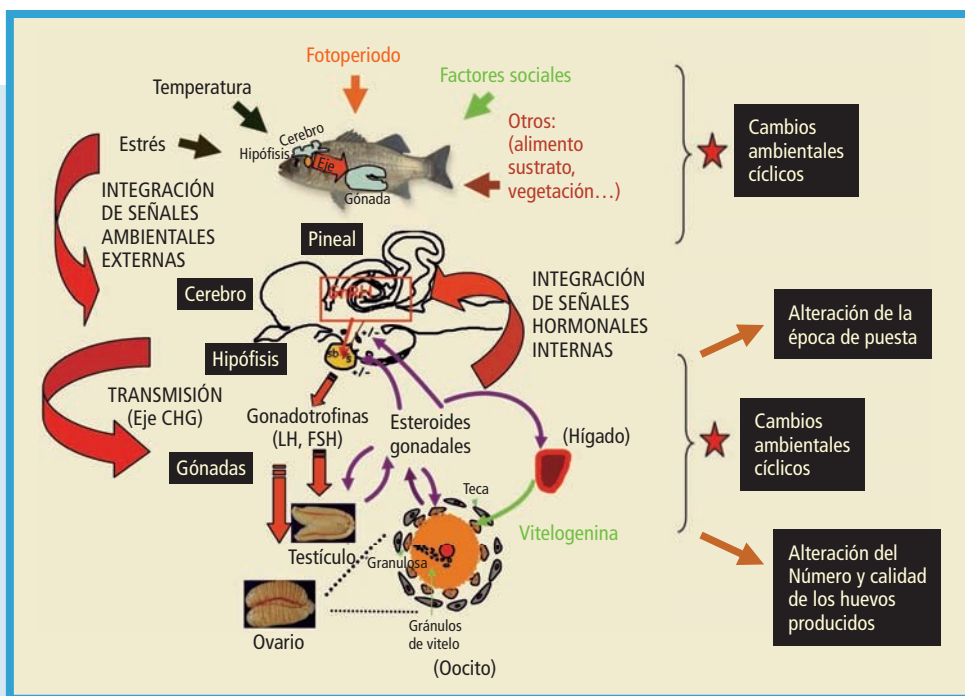


FIGURA 2.

Variaciones cíclicas de los factores ambientales que modifican la amplitud y la fase de los ritmos biológicos en los teleosteos, induciendo respuestas hormonales de naturaleza periódica que finalmente producen alteraciones en la época de puesta, en la calidad de los huevos y en la fecundidad. El cerebro integra y coordina tanto las provenientes del medio ambiente externo, como las del interno que se transmiten a través del eje cerebro-hipófisis-gónadas (CHG). Se ilustra, además, la producción de GnRHs que inducen la secreción de FSH (hormona folículo estimulante) y LH (hormona luteinizante) hipofisarias quienes, a su vez, son responsables de la producción de esteroides sexuales por parte de las gónadas.



torno ambiental (fig. 2). Los factores ambientales estimulan al sistema sensorial de forma periódica y a través de un mecanismo todavía poco conocido esta información es transducida, a nivel de los receptores sensoriales, e integrada por el cerebro. Éste produce neuropéptidos, generados también de forma rítmica, que luego serán transmitidos de forma jerárquica y siguiendo pautas circadianas de variación a través de un eje morfo-funcional conocido como el cerebro-hipófisis-gónada (CHG). Mas específicamente, la luz estimula a los fotorreceptores, localizados en la retina de los ojos laterales y también en la pineal, inhibiendo la síntesis y la liberación de melatonina que además, a su vez, puede estar modulada por las variaciones periódicas de la temperatura del agua (García-Allegue *et al.*, 2001). Estas variaciones en la producción de melatonina, desempeñan un papel predominante encauzando al sistema circadiano de los teleósteos y muy probablemente actuando sobre la síntesis y liberación de las hormonas liberadoras de las gonadotrofinas (GnRHs) como ocurre en los mamíferos (Guillespie *et al.* 2003). Sin embargo y a diferencia de lo que se observa en estos, los teleósteos no poseen eminencia mediana y por ello, las fibras que transportan GnRH entran directamente en la hipófisis hasta las células gonadotropas donde se libera. El GnRH(s) a su vez, regula la síntesis y la secreción de las gonadotrofinas (LH y FSH) en la hipófisis. Esta liberación y en concreto la de LH, se hace siguiendo unas pautas circadianas de variación que normalmente están en relación con los ritmos diarios del GnRH presente en la hipófisis (Bayarri *et al.* 2004). Finalmente las gonadotrofinas, en las gónadas, regulan la esteroidogénesis y la gametogénesis, actuando a través de receptores específicos. En general la FSH está implicada en los procesos tempranos de la gametogénesis y la LH en las etapas finales de maduración, ovulación y puesta (Yaron y Sivan, 2006). Por otro lado, los esteroides sexuales también siguen patrones circadianos de liberación por parte de las gónadas (Matsuyama *et al.*, 1990) y pueden presentar variaciones estacionales en sus ritmos diarios (Carrillo, *et al.*, 2006 en Bayarri *et al.*, 2009). Éstos, a su vez, presentan efectos de retroalimentación con la hipófisis y el cerebro modulando sus secreciones. El cerebro integra nuevamente estas señales internas estableciéndose un diálogo funcional entre este y los órganos periféricos. En consecuencia, cam-



bios de fase en las variaciones periódicas medioambientales provocan cambios de fase en la secreción hormonal a lo largo del eje cerebro-hipófisis-gónada y estos cambios de fase de los ciclos hormonales, son responsables de una alteración en la fase del ritmo de la respuesta del evento reproductor. Más específicamente, la exposición a distintos regímenes de luz (fotoperiodo) en los que se ha modificado la fase del ritmo lumínico, modifica la época del inicio de la gametogénesis, de la maduración, de la ovulación o de la puesta de los peces (Carrillo *et al.* 1993, 1995a). Por otro lado, cambios en la composición de las dietas que se administran a los reproductores (Carrillo *et al.*, 1995b, 2000), o alteraciones en los factores últimos como la temperatura, tienen incidencia sobre la fecundidad o la calidad de los huevos producidos (Zanuy *et al.* 1986) (fig. 2). Generalmente, estos factores son capaces de alterar la amplitud de un ritmo endocrino, pudiendo llevar incluso a la desaparición de los mismos y por tanto a la pérdida de la función reproductora que controlan (Carrillo *et al.* 2007a).

3.4. LA FOTOPERIODICIDAD Y TEMPERATURA EN LOS TELEÓSTEOS

Algunos mamíferos y aves requieren de una longitud absoluta crítica del fotoperiodo para iniciar la gametogénesis. Por ejemplo, en algunos roedores la reproducción y el metabolismo son activados por los días largos del verano (LD) e inhibidos por los días cortos del invierno (SD). La experimentación fotoperiodica reveló que existía un ritmo de sensibilidad a la luz que era encauzado por el fotoperiodo dominante. La luz incidente que coincidía con el período de máxima sensibilidad, provocaba una respuesta de activación positiva del proceso reproductor (respuesta tipo LD). Si la luz no coincidía con el periodo sensible el animal permanecía en reposo sexual. Además, esta respuesta de maduración gonadal a la luz podía variar entre las diferentes especies en función de su estrategia reproductora estacional (Hastings *et al.*, 1985). Esta teoría es conocida como la teoría del reloj de arena. En los peces teleósteos no es aplicable porque para iniciar los eventos reproductivos estos no precisan de un fotoperiodo de una longitud crítica determinada. La gametogenesis, la maduración y las puestas se produ-



cen igualmente en animales expuestos a fotoperiodos constantes, ya sean largos o cortos, e incluso bajo regimenes de luz o de oscuridad continua. Estos hechos indican que los teleósteos poseen mecanismos diferentes de respuesta a la luz con respecto a los mamíferos o a las aves. Estos aspectos serán desarrollados detalladamente en capítulos posteriores.

3.4.1. Los efectos del fotoperiodo en la alteración de la época de puesta

Los peces, por su condición de animales poiquiloterms, son reproductores estacionales y restringen sus períodos de puesta a momentos muy concretos del año en estrecha sincronía con las variaciones del fotoperiodo en la latitud donde se encuentran y de la temperatura del agua donde habitan. En la mayoría de teleosteos, de importancia para la acuicultura, particularmente los de latitudes medias y altas, las puestas suelen coincidir con temperaturas bajas y fotoperiodos cortos. Sin embargo, ante la gran diversidad de especies y estrategias reproductoras existentes en peces, las puestas pueden darse en cualquier época del año y la duración de las mismas puede variar desde unas pocas semanas a varios meses. Un hecho común a todas las especies de teleósteos es que de un año a otro y a lo largo de todo su período reproductor la época de puesta coincide siempre en el mismo intervalo de tiempo que además, es característico de cada especie. La lubina, una especie de gran importancia en acuicultura y que emplearemos como modelo en esta revisión, en el Mediterráneo noroccidental (40 °LN) presenta un periodo de puesta restringido a los meses de invierno, con temperaturas alrededor de 12 °C y fotoperíodos de 9-10 horas de luz: 15-14 horas de oscuridad (9-10 HL:15-14 HO). En años sucesivos las puestas ocurren invariablemente entre los meses de Enero-Marzo con pequeños adelantos o atrasos según las variaciones anuales térmicas del agua (Carrillo *et al.*, 1995a; Prat *et al.* 1999). Esta sincronía de la función biológica de la especie con las condiciones medio-ambientales, representa una ventaja para su supervivencia porque ajusta una función biológica a un período del año que es el más favorable para su supervivencia. Sin embargo, lo que resulta beneficioso para la especie, representa un problema para el acuicultor porque le obliga



a comercializar su producto en períodos del año muy restringidos. Además, no permite satisfacer las demandas, siempre crecientes, de la industria acuícola que necesita un suministro continuo de huevos y larvas a lo largo de todo el año. Los peces, gracias a su flexibilidad de adaptación, son capaces de sincronizar sus ritmos biológicos con las fluctuaciones periódicas ambientales para optimizar los recursos existentes. Sin embargo, una manipulación adecuada de los parámetros ambientales también puede alterar sus ritmos biológicos y ponerlos al servicio de la industria acuícola (Bromage *et al.*, 2001; Imsland, *et al.*, 2003; Begtashi *et al.*, 2004; Norberg *et al.*, 2004; Migaud *et al.*, 2006).

3.4.2. Respuesta a fotoperiodos y temperaturas naturales desfasados

El control ambiental mas generalizado de la reproducción de los peces mantenidos en criaderos industriales, está basado en simulaciones lo más ajustadas posibles, mediante el uso de relojes temporizadores, del fotoperiodo y de la temperatura a los de su hábitat natural. Estos criaderos disponen de un grupo de reproductores de referencia o controles que están expuestos a temperatura y fotoperiodo naturales simulados y que es el que proporciona las puestas en calidad y cantidad esperadas y en el período de tiempo propio de la especie. En general, el stock de reproductores debe estar estabulado en condiciones óptimas para poder evaluar los efectos de una manipulación ambiental sobre los parámetros reproductivos. Este stock de reproductores, previa identificación del sexo, debe estar formado por animales en edad óptima para reproducirse, estabulados a bajas densidades ($< 10\text{Kg} \times \text{m}^3$) y con la proporción de sexos adecuada (generalmente 1:1). A partir de este momento, este grupo control se puede utilizar como modelo para establecer posteriores alteraciones experimentales, orientadas a modificar la época de puesta natural de los animales. La estrategia utilizada por los criaderos para obtener desplazamientos significativos de la época natural de puesta es la de administrar, a diferentes grupos de reproductores, regímenes fotoperiodicos y térmicos desfasados en uno o varios meses, pero siempre manteniendo amplitudes rítmicas similares a la exhibidas por el grupo control (fig. 3). Generalmente existe



una correlación muy estrecha entre la magnitud del desfase fotoperiódico y la desviación del tiempo de puesta de los grupos experimentales con respecto al grupo control. Mientras mayor es el desfase existente entre los ciclos foto-térmicos, mayor será el retraso o adelanto que experimentan las puestas de los reproductores y a la inversa, cuanto menor sea este desfase ambiental, el período de puestas de los grupos experimentales tenderá a coincidir con las del grupo control. (Girin y Devauchelle, 1978; Bromage y Duston, 1986; Björnsson *et al.*, 1998; Bon *et al.*, 1999). El número de grupos experimentales puede ser tantos cuantos desfases se quiera obtener y teóricamente sería ilimitado. Sin embargo, la duración del período de puesta de la especie en cuestión es la que dicta el número de grupos experimentales que se deben organizar para obtener puestas todos los meses del año.

Como se indicó anteriormente, la duración media del período de puesta de la lubina es de tres meses. Si el desfase de la exposición rítmica al fotoperiodo y a la temperatura también es de tres meses, sólo sería preciso organizar cuatro grupos experimentales para obtener puestas todos los meses del año. En efecto, cuatro grupos experimentales expuestos a fotoperiodo y temperatura desfasados tres meses darían como resultado doce meses de puestas sin interrupción a lo largo de todo el año (fig. 3).

3.4.3. Respuesta a fotoperiodos naturales comprimidos y expandidos

Otro tipo de manipulación de los factores ambientales utilizada en acuicultura para modificar el tiempo del período de puesta del stock de reproductores de peces, ha sido la aplicación de ciclos de fotoperiodo comprimido o expandido respecto a las variaciones naturales de luz. (fig. 4C). Los fotoperiodos comprimidos son ciclos estacionales de luz comprimidos a períodos de tiempo más cortos de un año. Desde que Hoover (1937) demostró que los fotoperiodos comprimidos adelantaban la puesta de la trucha de arroyo (*Salvelinus fontinalis*) se han venido utilizando ciclos comprimidos, típicamente de 6 o 9 meses, en varias especies de teleósteos como el salmón, la trucha, la lubina americana y europea, el lenguado, el barbo, el bacalao y el fletán, entre otros, con adelantos de puesta entre 2 y 6 meses (Bromage y Duston,



1986; Beacham y Murray, 1993; Poncin, 1989; Blythe *et al.*, 1994; Bon *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2000; Norberg *et al.*, 2004) (fig. 4C). En general, mientras más comprimido es el fotoperiodo mas se suele adelantar la puesta. Los fotoperiodos expandidos son fotoperiodos cuyos ciclos tienen una duración mas larga de un año. Típicamente, se han utilizado fotoperíodos expandidos de una duración de 18 meses por ciclo, que han provocado retrasos de 3-6 meses en varias especies de teleósteos (Bromage y Duston, 1986; Norberg *et al.*, 2004) (fig. 4C).

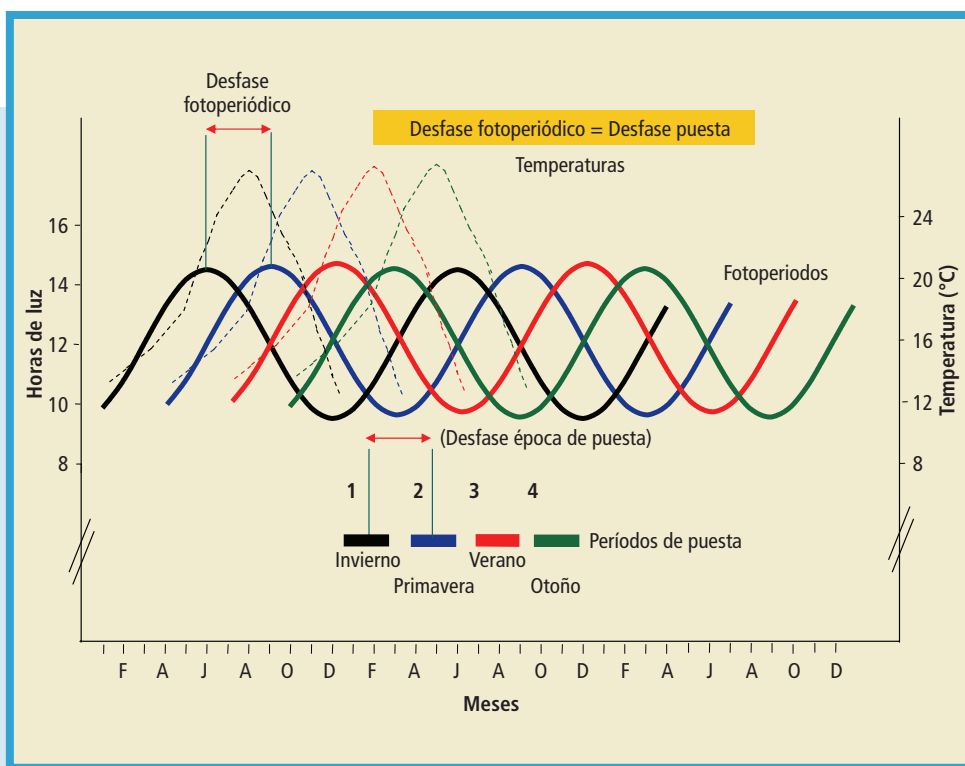


FIGURA 3.

Aplicación de cuatro desfases correlativos de los ritmos naturales de fotoperiodo y temperatura a intervalos de tres meses cada uno. Los cambios de fase de los factores ambientales provocaron desplazamientos proporcionales de la época de la puesta a lo largo de las cuatro estaciones del año. Dado que la duración de la puesta de la lubina es aproximadamente de tres meses, se obtuvieron puestas todos los meses del año. (Según Carrillo, Crespo y Zanuy, datos no publicados).

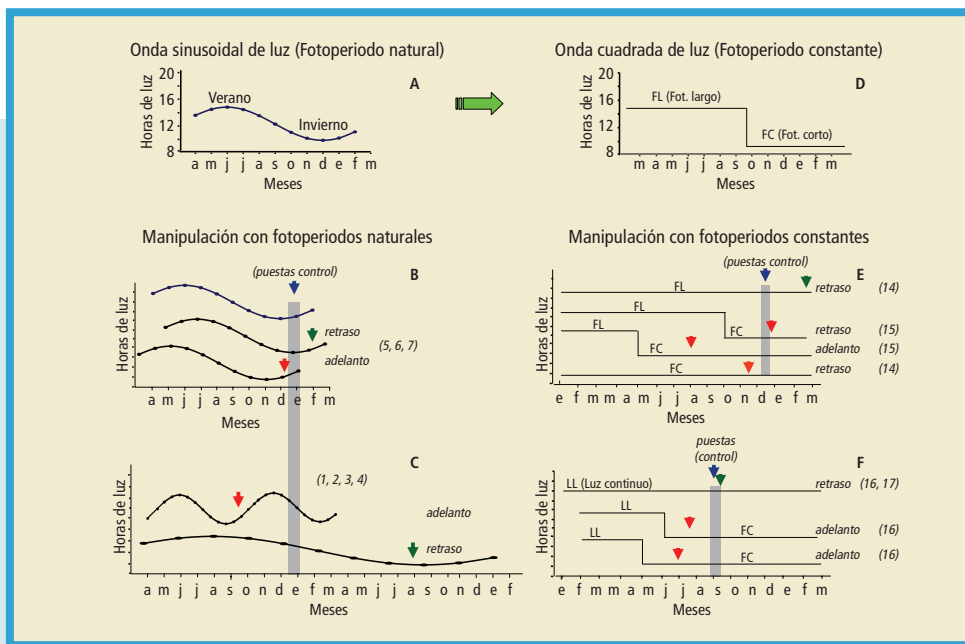


FIGURA 4.

Sustitución de los métodos de manipulación ambiental mediante cambios progresivos estacionales de luz por la aplicación de fotoperiodos constantes para alterar la época de puesta. A. Variación estacional natural del fotoperiodo (onda sinusoidal). B. Modificación de la fase de los ritmos naturales de luz sin alterar su duración. C. Contracción y expansión de los ciclos naturales de luz. D. Fotoperiodos largos y cortos constantes (onda cuadrada). E. Aplicación de fotoperiodos largos y cortos constantes solos o combinados. F. Aplicación de luz continua y fotoperiodos cortos constantes, solos o combinados. Las flechas verticales indican la época de puesta. 1) Girin y Devauchelle (1978); 2) Bromage *et al.* (1982); 3) Blythe *et al.* (1994); 4) Howell *et al.* (2003); 5) Zohar *et al.* (1995); 6) Björnsson *et al.* (1998); 7) Hoover (1937); 8) Pavlidis *et al.* (2001); 9) Vuthiphandchai *et al.*, 2002; 10) Rodríguez *et al.* (2000); 11) Norberg *et al.* (2004); 12) Blythe *et al.* (1994); 13) Bromage *et al.* (1993); 14) Prat *et al.* (1999); 15) Bromage *et al.* (1984); 16) Franztzen *et al.* (2004); 17) Carrillo y Zanuy (resultados no publicados).

En reproductores expuestos a ciclos comprimidos o expandidos de luz, existe una diferencia relativa de la fase angular entre los tiempos de las puestas esperadas y las observadas. Esta diferencia entre la época de la puesta y el desfase fotoperiodico es mas acusada mientras mas expandido o contraído sea el ciclo de luz (Bromage *et al.*, 1993).



3.4.4. Respuesta a fotoperiodos constantes

La manipulación ambiental que emplea ciclos naturales de luz (o temperatura) desfasados, expandidos o comprimidos, aunque efectiva en alterar la época de puesta de los reproductores, necesita una programación un tanto compleja de los relojes temporizadores para regular, de forma precisa, las variaciones térmicas o fotoperiodicas del medio ambiente, especialmente en aquellas especies de teleósteos que presentan ciclos de maduración dilatados. No obstante, esta manipulación se puede simplificar en gran medida mediante la aplicación de ciclos foto-térmicos constantes sin que por ello se pierda efectividad en la regulación de los ciclos reproductores. Se ha comprobado que los incrementos o disminuciones progresivas de luz y temperatura, característicos de las diferentes estaciones del año y que producen alteraciones profundas en la época de puesta, pueden ser reemplazados por ciclos foto-térmicos de longitud constante o por una combinación de ellos (Bromage *et al.*, 1984, 1992; Carrillo *et al.*, 1989, 1993; Zanuy *et al.*, 1995; Amano *et al.*, 1995; Prat *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2004) (fig. 4A y 4D). Generalmente, se adoptan los valores máximos o mínimos de fotoperiodo alcanzados en los solsticios de verano o invierno, se asumen como fotoperíodos largos o cortos, respectivamente y se aplican a un supuesto experimental concreto para alterar la época de puesta de los peces. Por otro lado, también se han utilizado fotoperiodos constantes de 24 horas de luz en instalaciones acuícolas de latitudes extremas. Estos regímenes de iluminación se han usado, en principio, para compensar los crecimientos reducidos de los peces debido a la escasa iluminación reinante durante el otoño e invierno (Boeuf y Le Bail, 1999; Taylor *et al.*, 2005), aunque también se han observado efectos sobre la maduración sexual (Oppedal *et al.*, 1997; Taranger *et al.*, 1998, Endal *et al.*, 2000; Porter *et al.*, 1999; Schulz *et al.*, 2006) (fig. 4F). Los fotoperíodos, sean largos o cortos, se suelen administrar de forma ininterrumpida a lo largo de un período determinado. La administración de fotoperiodos cortos constantes a lo largo de todo el ciclo sexual, indujo un adelanto del período de puesta y de su regulación hormonal, de alrededor de dos meses en la lubina y en el salmón masu. Por el contrario, la administración de fotoperío-



dos largos constantes indujo un retraso de los ciclos madurativos, en estas mismas especies, también de alrededor de dos meses (Prat *et al.*, 1999; Bromage *et al.*, 1984) (fig. 4E). Es sabido que muchas especies de Salmoniformes y Perciformes efectúan sus puestas naturalmente a principios del invierno, cuando los fotoperiodos son los más cortos del año. Este hecho ayuda a explicar porque estas especies maduran y efectúan sus puestas en respuesta a la administración (durante un período determinado) de fotoperíodo largo constante, seguido luego de fotoperíodo corto constante. Si el cambio de fotoperíodo largo a corto se produce en épocas más tempranas del año, las puestas se adelantan y a la inversa, cuanto más tarde se aplica en el año, las puestas se atrasan. Más específicamente, los estudios realizados en la trucha por Bromage *et al.*, (1984) demostraron que la administración de fotoperíodo largo constante de 18HL: 6HO, hasta el mes de Octubre, seguido en los meses subsiguientes por fotoperíodo corto de 6HL:18HO de duración, determinó que las puestas sólo se adelantasen en quince días respecto a los controles. Sin embargo, cuando el cambio fotoperiodico se hizo en Mayo las puestas se adelantaron cuatro meses con respecto al grupo control (fig. 4E). La combinación de luz continua (en lugar de fotoperíodos largos) con fotoperíodo corto constante también fue efectiva en el adelanto de las puestas. En la trucha ártica la aplicación de luz continua (24h luz x día⁻¹) de Febrero a Junio, seguido por fotoperíodos cortos (6HL:18HO) de Junio en adelante, adelantó las puestas 7 semanas respecto al grupo control. En cambio, la aplicación de luz continua de Febrero a Mayo, seguido luego de fotoperíodos cortos, adelantó la puesta en 10 semanas (Franzzen *et al.*, 2004) (fig. 4F). Se ha visto que el fotoperíodo largo, de apenas un mes de duración, precedido y seguido de fotoperíodo corto constante y aplicado en distintos periodos del ciclo sexual, es suficiente para provocar una alteración significativa de la época de puesta (Bromage *et al.* 1984; Takashima y Yamada, 1984; Carrillo *et al.* 1989, 1991, 1993, 1995a) (fig. 5). Estos trabajos demostraron que estas exposiciones cortas a fotoperíodo largo provocaban un adelanto de la época de puesta tanto mayor, cuanto más temprana era su aplicación durante el ciclo sexual. Si la exposición a fotoperíodos largos, de corta duración, se hacía en épocas más tardías del año, particularmente después del período en que se alcanzaban los máximos tér-



micos del agua de mar (Agosto), las puestas se atrasaban en relación a las de los controles (fig. 5). Una serie de trabajos realizados en la lubina (rev. Carrillo *et al.* 1995) acerca de los efectos negativos de la temperatura elevada sobre la puesta, demostraron la existencia de un umbral

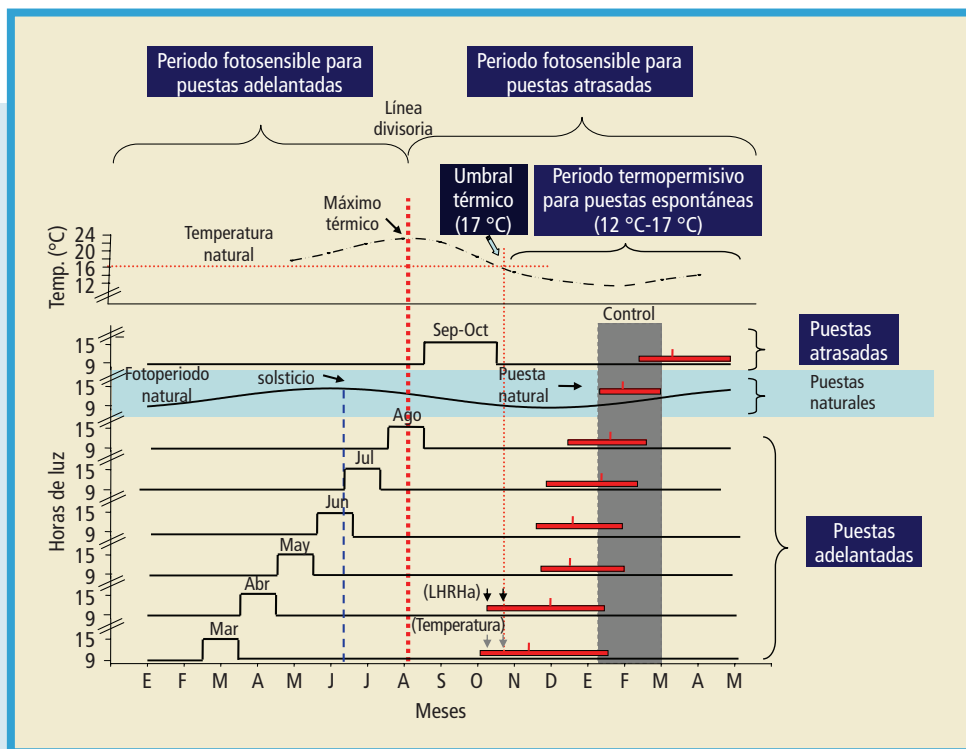


FIGURA 5.

Manipulación fotoperiódica para alterar la época de puesta de la lubina mediante fotoperiodos largos (15HL:9HO), de 1-2 meses de duración, precedidos y seguidos por fotoperiodos cortos (9HL:15HO). La aplicación de fotoperiodos largos antes del período del máximo térmico anual de Agosto (línea vertical punteada gruesa) adelanto las puestas (barras horizontales) con respecto al grupo control (sombreado gris vertical). La exposición a fotoperiodos largos después del máximo térmico produjo retrasos. Las puestas ocurrieron espontáneamente entre 12 °C-17 °C. Sin embargo, por encima de 17 °C fue preciso administrar LHRHa (flechas verticales negras) o reducir artificialmente la temperatura (flechas verticales grises) para obtenerlas. En consecuencia, existe un umbral térmico de 17 °C (líneas punteadas finas) por encima del cual se bloquea la liberación espontánea oocitos en hembras de lubina maduras. La línea azul vertical de trazos indica el solsticio de verano. (Modificado de Carrillo *et al.*, 1995)a.



térmico que si se rebasaba producía una inhibición de la misma cuando la temperatura superaba los 17 °C. Estos aspectos serán tratados al detalle más adelante en la sección correspondiente.

Existe una línea teórica que separa por un lado, los periodos del año foto-inducibles para obtener puestas adelantadas y por otro, aquellos que provocan puestas atrasadas con respecto al grupo control. La ubicación de ésta línea divisoria es específica de cada especie. Así por ejemplo, en los salmónidos (trucha) se ubica en la época coincidente con el solsticio de verano (Bromage *et al.*, 1993) y en la lubina en la época de valores térmicos máximos (Carrillo *et al.* 1993) (fig. 6). La

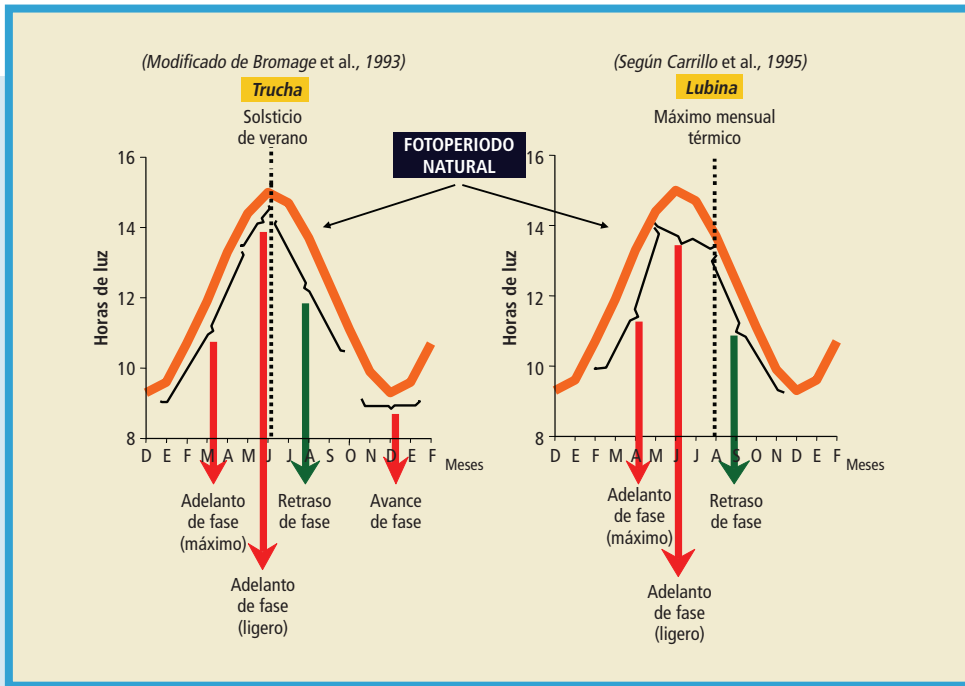


FIGURA 6.

Efectos de los fotoperiodos largos para encarrilar los ritmos endógenos implicados en el control de la maduración de la trucha y de la lubina. En la trucha, la aplicación de fotoperíodos largos antes del solsticio de verano, adelantó la fase del ritmo reproductor anticipando las puestas. Si la exposición fotoperiodica se hacía después del solsticio de verano las puestas se atrasaban.

En la lubina, la línea divisoria de puestas adelantadas y atrasadas, con respecto al control, coincidió con el máximo térmico mensual antes que con el solsticio de verano.



identificación de esta línea divisoria se ha realizado mediante rastreos temporales de los efectos de la aplicación de fotoperiodos largos constantes en la alteración del tiempo de las puestas. De esta manera, si la exposición a fotoperiodo constante se efectúa por detrás de esta línea divisoria se obtendrán adelantos en las puestas respecto a las del grupo control y si la aplicación fotoperiodica se hace por delante de esta línea se inducirán atrasos en las puestas. Estos resultados nos permiten concluir que el uso combinado de fotoperiodos constantes constituye una herramienta metodológica muy efectiva para alterar la época de puestas de varias especies de teleósteos, tomando muy en cuenta su momento de aplicación en un período determinado del año.

3.4.5. La temperatura como factor limitante de la puesta

Otra consecuencia derivada de estos estudios fue la demostración de que el efecto de la manipulación fotoperiódica en la alteración de las puestas estaba limitado por la temperatura. Los estudios en salmónidos generalmente se hacían a temperatura baja constante propia de aguas de manantial (Bromage *et al.*, 1984; Takashima y Yamada, 1984). En cambio, los de la lubina fueron realizados a temperatura ambiente siguiendo las fluctuaciones naturales del agua de mar. Esto permitió confirmar la existencia de un umbral térmico para que las puestas de la lubina tuvieran lugar de manera espontánea. Anteriormente ya se había identificado este umbral (Zanuy *et al.* 1986; Devauchelle y Coves, 1988) al constatar que las ovulaciones y las puestas sólo se producían, de forma espontánea, cuando el rango de temperatura era 9-17 °C. Por encima de 17 °C la puesta de las hembras se bloqueaba a pesar de haber alcanzado la maduración, de modo que esta sólo se obtenía tras administrar análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRHa). Al reducir la temperatura del agua de mar por debajo de 17 °C (fig. 5) se obtuvieron puestas espontáneas. Sin embargo, los machos se mantuvieron espermiantes aún a temperaturas elevadas. La exposición a un régimen de fotoperiodo largo, de un mes de duración, en un régimen constante de fotoperiodo corto, aplicado en el intervalo de Agosto-Mayo, adelantó las puestas hasta tres meses con respecto a los controles. En efecto, las puestas de los grupos trata-



dos con fotoperiodos constantes tuvieron lugar de forma espontánea entre Octubre-Diciembre, frente a los controles que se dieron entre Enero-Marzo. Las temperaturas naturales del agua de mar durante estos meses se mantuvieron por debajo de los 17 °C. Las hembras, una vez alcanzada la maduración sexual, ovularon de manera espontánea efectuando sus puestas en el período esperado de acuerdo al tiempo de aplicación de los diferentes regímenes de fotoperiodo constante. Sin embargo, los grupos más extremos, es decir aquellos que recibieron fotoperiodo largo constante en los meses de Marzo o Abril, en los que se esperaba obtener puestas entre Octubre-Noviembre, no llegaron a poner a pesar de que sus gónadas tenían un porcentaje elevado de oocitos postvitelogénicos y en maduración. Probablemente la explicación a este hecho está en que las temperaturas del agua de mar durante Octubre y Noviembre estuvieron por encima de los 17 °C. En estos grupos las puestas espontáneas se obtuvieron tras la administración de LHRHa o la disminución de la temperatura hasta 15 °C. (fig.5). Todos estos resultados apoyan la hipótesis del un posible papel permisivo de la temperatura, especialmente en las etapas finales de la reproducción y del más que posible papel directivo del fotoperiodo al alterar las fases rítmicas de las ondas reproductivas.

3.4.6. Mecanismos de acción

La historia fotoperiodica es muy relevante para alterar la época de puesta de los peces teleósteos. Sin embargo, la longitud absoluta del fotoperiodo no parece ser importante en la sincronización de los eventos reproductivos.

Más específicamente, los cambios relativos de fotoperiodo corto a largo y viceversa, son clave para el control de su temporalidad. Además, un supuesto fotoperiodo largo basado en la duración del día, podría ser considerado corto si éste estuviese precedido de un fotoperiodo aún mas largo y viceversa, un supuesto fotoperiodo corto podría ser considerado largo si éste estuviera precedido por otro aún mas corto (fig. 7A).

Expuestos así estos conceptos, llegamos a la conclusión de que la denominación de días largos o cortos, solamente es relativa y depende exclusivamente de su historia previa. En la figura 7B se ilustran más

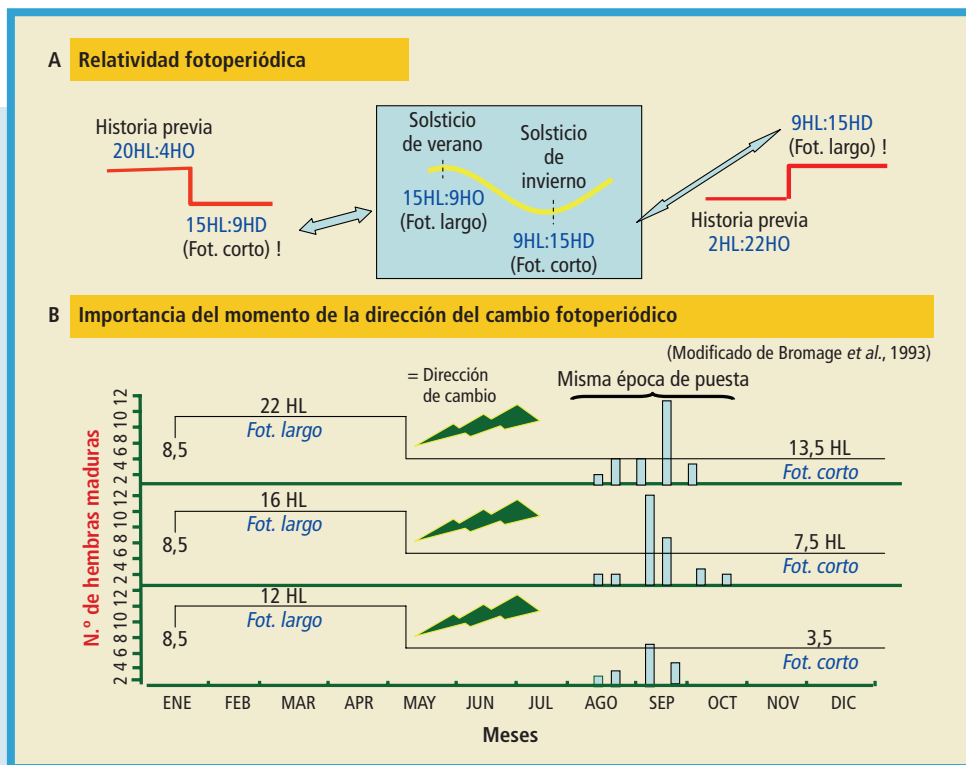


FIGURA 7.

A) Importancia de la historia fotoperiódica capaz de relativizar la definición de los fotoperiodos largos y cortos. Un fotoperiodo considerado como largo (basado en su longitud absoluta), podría convertirse en corto si su historia previa indicase que provenía de otro fotoperiodo aún mas largo y viceversa. B) La longitud absoluta de un fotoperiodo no es relevante para modificar la época de puesta, pero sí lo es el momento en el que se realiza el cambio de dirección fotoperiódica (p.ej., de largo a corto). Fotoperiodos con la misma dirección de cambio producen tiempos de puestas similares.

claramente estos conceptos: fotoperiodos de longitudes absolutas diferentes fueron considerados largos a pesar de tener longitudes de 22HL, 16HL o 12 HL, dado que éstos fueron precedidos por fotoperiodos aún mas cortos que ellos tales como 13,5HL, 7,5HL o 3,5HL, respectivamente. Además, como en todos ellos el cambio de la longitud se realizó en la misma época (Mayo), el tiempo de puesta permaneció relativamente constante (de Agosto a Octubre).



3.4.7. Interacciones fotoperiodicas y térmicas

En determinadas especies de ciprínidos, carpas, bagres y otros peces subtropicales, las temperaturas elevadas y los fotoperíodos largos parecen ser muy relevantes para que se de la maduración final de los oocitos, la ovulación y la ovoposición (Bromage *et al.*, 2001). Sin embargo, es muy difícil discriminar claramente entre los efectos de la temperatura y los del fotoperíodo dado que en la naturaleza estos dos factores casi siempre suelen ir asociados. De todas maneras, en los peces y muy en particular en especies de latitudes templadas, el fotoperíodo parece ser determinante para el control de los ritmos endógenos o relojes involucrados en la alteración del tiempo de maduración, mientras que la temperatura podría actuar de una manera permisiva en la entrada de estos procesos endógenos. Obviamente, se espera que la temperatura tenga un papel importante en las especies poiquilothermas modulando todos los procesos fisiológicos y los mecanismos endócrinos. Es más, se ha sugerido, que la temperatura podría tener un efecto directo sobre las gónadas (Bromage y Cumaratunga, 1988). En general, la ejecución de la práctica totalidad de los eventos reproductores y muy particularmente la maduración, ovulación o la liberación de los gametos, requieren de temperaturas óptimas de ejecución para así lograr el éxito reproductor. En caso contrario las temperaturas podrían actuar como un factor limitante del mismo. Además, los valores térmicos que bloquean determinados procesos reproductivos son específicos de cada especie y hay que caracterizarlos cada vez que se estudia una nueva especie. Así por ejemplo, se han podido establecer umbrales térmicos específicos, para algunas especies, por encima de los cuales la maduración y la ovulación resultan inhibidas: $\geq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el fletán, *Hippoglossus hippoglossus* (Brown *et al* 1995); $\geq 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el salvelino, *Salvelinus alpinus* (Gillet 1991); $\geq 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el arenque del Pacífico, *Clupea pallasii* (Hay 1986); $\geq 12\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el salmón del Atlántico, *Salmo salar* (Taranger and Hansen, 1993); $\geq 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el esturión blanco, *Acipenser transmontanus* (Webb *et al.* *et al* 1999) y trucha arcoiris, *Oncorhynchus mykiss* (Pankhurst *et al.*, 1996); $\geq 17\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la lubina, *Dicentrarchus labrax* (Zanuy *et al.*, 1986) y $> 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la carpa herbívora, *Ctenopharyngodon idella*



(Glasser et al 2004). Tomando la lubina como especie modelo (Carrillo *et al.*, 1995a) se puede ver este tipo de estudios con un poco más de detalle. La temperatura del agua durante la época de puesta de la lubina generalmente es baja, al coincidir con la época invernal. Si se produjera una elevación de la temperatura por encima de las habituales de invierno (p.ej. inferiores a 17 °C), se podría retrasar el periodo de puesta pero con reducciones importantes en la fecundidad y calidad de puesta que, en el peor de los casos, podría verse inhibida. El estudio de series históricas acerca de las variaciones estacionales de la temperatura del agua de mar, en relación con los periodos de la puesta de esta especie, mostró que años particularmente calurosos provocaban un retraso de hasta un mes en la época normal de puesta, que en el Mediterráneo Occidental (40 °LN) ocurre en los meses de Enero a Marzo. En cambio, los años que fueron particularmente fríos, mostraron un adelanto de las mismas de hasta un mes, con respecto a la de los años de temperaturas normales (fig 8A). Con el fin de verificar experimentalmente este comportamiento natural de las puestas respecto a los cambios térmicos ambientales, se estudio el comportamiento de dos grupos experimentales, cada uno con un número significativo de reproductores machos y hembras ($n = 20/\text{grupo}$; relación de sexos 1:1) y sus respectivos controles. A los reproductores del primer grupo se les sometió a un calentamiento artificial del agua de mar, por encima de los 17 °C, durante el otoño y principios de invierno hasta el mes de Febrero, fecha en la que se disminuyó, progresivamente, la temperatura del agua de mar (fig. 8B). Al segundo grupo se les enfrió el agua por debajo de 17 °C a partir de Septiembre (fig. 8C). En el primer grupo la puesta se presentó dos meses mas tarde que el grupo control mostrando, además, tasas elevadas de atresia ovocitaria. Este grupo desovó espontáneamente a partir de Febrero cuando las temperaturas estuvieron por debajo de los 17 °C (umbral térmico para la lubina). En cambio, el grupo mantenido a temperaturas bajas adelantó el tiempo de puesta en dos meses y además, la calidad de las mismas fue semejante a la del grupo control. Por otro lado, el tratamiento combinado de temperaturas bajas con fotoperiodos aceleradores adelantó la época de puesta hasta en cuatro meses.



El uso de fotoperíodos constantes combinado con manipulaciones térmicas para alterar el tiempo de maduración, ovulación y ovoposición de los peces, puede ser muy efectivo y no alterar la calidad de

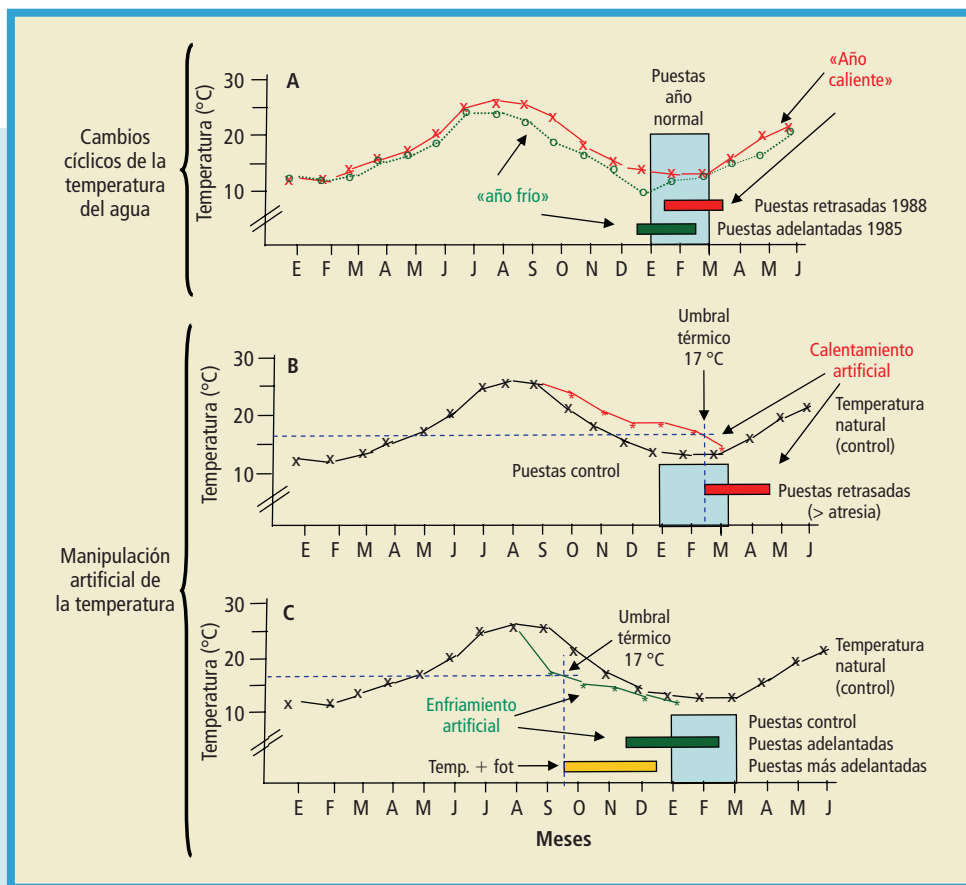


FIGURA 8.

Efectos de la manipulación térmica sobre la época de puesta de la lubina. A. Puestas retrasadas obtenidas en años considerados como calientes y adelantadas en años fríos. B.- Efectos del calentamiento artificial del agua de mar por encima de 17 °C, durante el otoño y principios de invierno, en el atraso de las puestas. C.- Efecto del enfriamiento del agua de mar por debajo de 17 °C, durante el otoño, en el adelanto de las puestas. Se indican los efectos de un tratamiento combinado de enfriamiento térmico y fotoperíodo acelerador en el adelanto de las puestas. En B y C se muestra el umbral térmico por debajo del cual se producen puestas espontáneas. (Modificado de Carrillo *et al.*, 1995a).



las puestas, si las variaciones de estos parámetros se hacen siguiendo los patrones existentes en la naturaleza. Una manipulación inadecuada tiene consecuencias negativas sobre el animal adulto, alterando su comportamiento y su fisiología, particularmente sobre la regulación endocrina del proceso reproductor. Ello puede llevar, inevitablemente, a una inhibición o retraso de las puestas o a un deterioro significativo de la calidad de las mismas. La estrecha sincronía del animal con su entorno ambiental le permite acoplar sus funciones biológicas a la presencia de los parámetros ambientales que son más favorables para su supervivencia. En el caso particular de la lubina, en condiciones naturales del Mediterráneo occidental a 40 °LN, efectúa sus puestas entre Enero-Marzo. Durante este período, el fotoperiodo es corto (<121HL:13HO) y las temperaturas bajas (<14 °C) (fig. 9A). En condiciones naturales, los reproductores hembra presentan un modelo unimodal de variación de los niveles de estradiol plasmático (E_2) con valores máximos en Enero que varía, en paralelo, con las tasas de oocitos en vitelogénesis. Un mes más tarde se observa un máximo en los niveles de LH y de esteroides inductores de la maduración (MIH), coincidiendo con el periodo en que aparecen las ovulaciones y las puestas y alcanzando una fecundidad relativa de 257.000 huevos/Kg (Zanuy *et al.* 1995). Al igual que en los controles, en el grupo experimental de hembras expuestas a fotoperíodos cortos constantes y temperatura natural (fig. 9B), durante el periodo de puesta, coincidieron temperaturas bajas (<14 °C) y fotoperiodo corto (9HL:15HO). Esta sincronía ambiental, aplicada a este grupo experimental, también se reflejó en el perfil hormonal de E_2 que fue unimodal, a similitud con los controles, con un máximo en Enero pero con un adelanto de un mes en la primera elevación significativa de este esteroide. Este adelanto de los patrones hormonales produjo, también, un avance de la época media de puesta hacia mediados de Enero apareciendo, como era de esperar, un máximo de atresia una vez finalizadas las puestas. Este tratamiento no afectó ni a la calidad de los huevos, ni a la fecundidad que alcanzó los 230.000 huevos/Kg (fig. 9B). En cambio, cuando se aplicaron experimentalmente fotoperíodos largos constantes en régimen de temperaturas naturales, los efectos fueron muy distintos (fig. 9C). En este caso, durante la época de puesta, las condiciones ambientales fue-

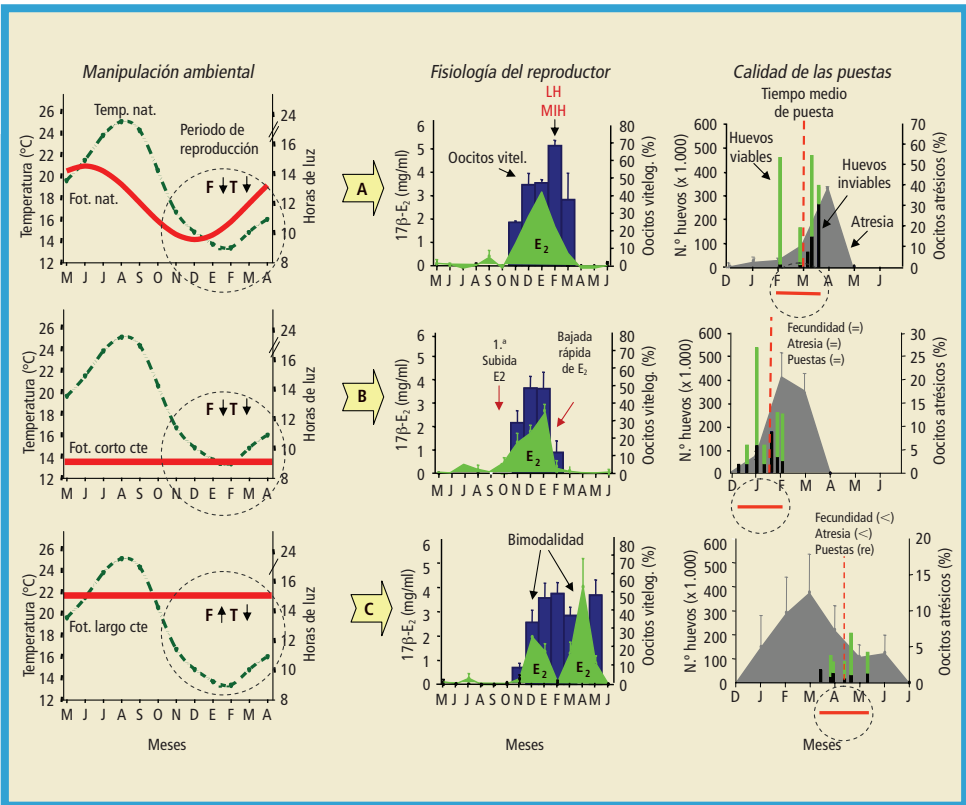


FIGURA 9.

Efectos de la manipulación ambiental sobre la fisiología del reproductor y la calidad de las puestas. A.- Fotoperiodo y temperaturas naturales durante el periodo de puesta (Diciembre-Marzo, círculo punteado) coincidencia de temperaturas bajas ($<14^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodos cortos ($<12\text{aHL}:13\text{HO}$) (ambas flechas hacia abajo). Variación unimodal del estradiol con un pico en Enero en correlación con el porcentaje de oocitos vitelogénicos. Se indican los picos de LH y MIH en Febrero época media de puesta a finales de Febrero; fecundidad relativa (FR) y pico de atresia a finales de las puestas. B.- Fotoperiodo corto constante ($9\text{HL}:15\text{HO}$) y temperaturas naturales bajas durante el periodo de puesta (ambas flechas hacia abajo). Incremento unimodal temprano del estradiol; adelanto de la época media de puesta hacia mediados de Enero; FR ligeramente reducida; pico de atresia al final de las puestas. C.- Fotoperiodo largo constante ($15\text{HL}:9\text{HO}$) y temperaturas naturales durante la época de puesta (flechas opuestas hacia arriba y hacia abajo); modelo bimodal del estradiol; gran cantidad de atresia con un máximo antes de las puestas; retaso de las puestas hacia Abril; disminución de la FR. (Modificado de Zanuy *et al.*, 1995).



ron opuestas a las que se dan naturalmente en invierno: fotoperiodos largos (15HL:9HO) y temperaturas bajas ($<14^{\circ}\text{C}$). En consecuencia, los perfiles hormonales resultaron alterados presentando variaciones bimodales de E_2 con picos en Diciembre y Abril, generando una gran cantidad de atresia oocitaria que produjo una drástica disminución de la fecundidad (124.000 huevos/Kg) y retraso las puestas hasta el mes de Abril (fig. 9C).

3.4.8. Conclusiones

1. Los peces muestran adaptaciones biológicas en estrecha sincronía con los cambios cíclicos ambientales de luz y temperatura. Estos, a su vez, generan patrones hormonales rítmicos que regulan eficazmente los procesos reproductores. Como resultado de esas adaptaciones, las puestas se producen en la época del año más propicia para el desarrollo y supervivencia de la progenie, siendo la calidad de los huevos y larvas la óptima esperada.
2. La manipulación inadecuada del fotoperiodo y de la temperatura puede tener consecuencias adversas en los modelos de ritmicidad hormonal del reproductor, afectando claramente a la época de puesta y a la fecundidad y calidad y de los huevos producidos.

3.5. RITMOLOGÍA DEL PROCESO REPRODUCTOR EN TELEÓSTEOS

3.5.1. Ritmos endógenos

3.5.1.1. Conceptos y requerimientos necesarios para su aceptación

La alternancia de los días y de las noches, en un ciclo de 24 horas de luz-oscuridad, es el sincronizador más efectivo para los ritmos diarios que presentan los organismos vivos. Estos ritmos no son entes meramente pasivos en respuesta a estas variaciones, sino que las oscilaciones se mantienen, aún en ausencia de variaciones de la señal ambiental externa, con una periodicidad cercana pero significativamente diferente a la de un ciclo de 24 horas con ritmos de libre recorrido (ritmos circadianos), indicando de esta manera que existe un reloj endógeno o meca-



nismos de cronometraje (Edmunds, 1988). De manera similar, los ritmos circa-anales son ritmos endógenos que fluctúan con una periodicidad cercana a la anual, pero con una fase significativamente diferente a la del período de un año. Por tanto podemos concluir que a lo largo de la evolución, los seres vivos han desarrollado osciladores moleculares endógenos o relojes biológicos como los circadianos o los circa-anales y que gracias a ellos, son capaces de predecir y anticiparse a los cambios diarios o anuales de un determinado evento que ocurrirá, en un tiempo apropiado, como consecuencia de los cambios astrales (Schulz y Kay, 2003). Los ritmos de maduración y puesta en los teleósteos se producen invariablemente en unas épocas muy concretas del año, dependiendo de la especie, y siempre en estrecha correlación con los factores ambientales. Sin embargo, estos ritmos de reproducción no se pueden suprimir aún eliminando las variaciones ambientales que podrían influir sobre ellos, como por ejemplo si se los mantuviera en condiciones constantes de luz, temperatura, alimentación, salinidad, etc., durante tiempos relativamente largos (p.ej. más de dos años). Los procesos reproductores de los peces igualmente seguirán manifestándose pero mostrando recorridos libres, con periodicidades cercanas al año aunque significativamente distintas de éste. Con el transcurso del tiempo estos ritmos de recorrido libre ostentarían atrasos o adelantos progresivos, con respecto a los ritmos normales, pero podrían ser encarrilados nuevamente a las condiciones normales si se les expone a estímulos externos tales como el fotoperiodo. Los estudios destinados a verificar la existencia de ritmos endógenos en los peces son largos, costosos y necesitan satisfacer una serie de criterios para su completa aceptación:

1. Condiciones constantes de estabulación (fotoperiodo, temperatura, alimentación, ruidos)
2. Varios ciclos anuales de estudio (preferiblemente más de cuatro)
3. Existencia de ritmos de recorrido libre con periodicidades cercanas, pero significativamente diferentes de un año.
4. Estos ritmos tienen que ser encarrilados fácilmente ante la exposición a una señal externa (p ej. administración de una señal fotoperiodica).
5. Estos ritmos no deben ser excesivamente perturbados por la temperatura.



6. Deben presentar respuestas diferenciales ante distintos fotoperiodos.

Los estudios que han podido identificar ritmos endógenos de reproducción en los peces son escasos. Así pues, sólo se han podido identificar ritmos endógenos que cumplan con todos estos requisitos en una media docena de especies; en el pez gato de la india, *Heteropneustes fossilis* (Sundararaj *et al.* 1982), en el espinoso, *Gasterosteus aculeatus* (Baggerman, 1980), en la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* (Bromage *et al.*, 1984; Duston y Bromage, 1991; Randall *et al.* 1999); en la lubina, *Dicentrarchus labrax* (Carrillo 1993; Prat *et al.*, 1999); en el barbo, *Barbus barbus* (Poncin 1991) y en el fletán, *Hyppoglossus hypoglossus*, (Björnsson, *et al.*, 1998).

3.5.1.2. Ritmos endógenos circa-anales: un caso de estudio

La lubina es un reproductor estacional. A una latitud de 40° Norte, en esta especie los machos alcanzan la espermiación entre Noviembre y principios de Abril y las hembras efectúan sus puestas en invierno entre los meses de Enero a Marzo. Generalmente, en años sucesivos, la época de puesta se mantiene constante excepto cuando, ocasionalmente, se dan alteraciones térmicas naturales que provocan pequeñas variaciones temporales de las mismas. Los perfiles de las hormonas reproductoras también muestran cambios estacionales que siguen, estrechamente, las ondas reproductivas del animal que a su vez están en sincronía con las variaciones ambientales. Para averiguar si los ritmos reproductores de la lubina se presentaban aún en condiciones ambientales constantes, se mantuvieron tres grupos de reproductores, de 20 individuos cada uno, en fotoperiodo corto constante (9HL:15HO; FC), fotoperiodo largo constante (15HL:9HO) y fotoperiodo natural simulado (40 °LN) o control, durante cuatro años consecutivos (Prat *et al.* 1999). El régimen de alimentación fue también constante, tres veces por semana a las 10h, a una tasa constante del 2,2% de la biomasa. Los ejemplares estuvieron aislados mediante toldos negros a prueba de luz y la temperatura del agua fue la natural. Los huevos se recogieron a través de mallas colocadas en un sumidero externo a los tanques que se revisaba diariamente. Los resultados se indican en la figura 10.



Al primer año de tratamiento el fotoperiodo corto (FC) produjo un avance de las puestas de 53 días respecto al control, y el largo (FL) las retrasó 41 días. Estos resultados cumplen con uno de los requisitos mencionados anteriormente, los ritmos endógenos deben representar respuestas diferenciales ante diferentes fotoperiodos. Por otro lado, la demostración de la existencia de ritmos con periodicidad cercana pero significativamente distinta a un año se tuvo con las puestas del FC. Este grupo, a lo largo de los cuatro años consecutivos de experimentación, manifestó periodos de recorrido libre; el primer año mostró un adelanto de 53 días respecto a la época de puestas del grupo control, en el segundo el adelanto fue de 38 días, en el tercero de 27 días y en el cuarto de 9 días (fig. 10A). De manera similar, aunque en un espacio de tiempo mas corto, el grupo FL al primer año presentó un atraso de 41 días y al segundo de 48 días con respecto a las puestas del grupo control (fig.10C). El encarrilamiento de los ritmos endógenos por una señal fotoperiodica se ilustra en la fig. 10B. El fotoperíodo largo aplicado en Mayo, seguido y precedido por fotoperiodo corto, produjo un adelanto de dos meses, en la época de puesta, cuando se administró a los reproductores sujetos a fotoperiodo corto constante que presentaron ritmos de recorrido libre. El fotoperiodo largo aplicado en Abril o Marzo produjo mayores avances en las puestas que a su vez, fueron proporcionales a la exposición más temprana en el año al fotoperiodo largo. Finalmente, una nueva exposición del grupo, proveniente del fotoperiodo largo en Marzo, a fotoperiodo corto constante, indujo periodicidades de puesta de recorrido libre (fig. 10B).

3.5.1.3. Mecanismos de acción

Cuando el reloj endógeno está gobernado y en fase con los ciclos naturales de luz, el animal percibe que la señal luminosa aparece en el momento más apropiado del ciclo para sincronizar los eventos reproductivos cuando se espera que ocurran naturalmente. En la fig. 11A, se muestra que en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura, el tiempo transcurrido desde el solsticio de verano hasta la aparición de las primeras puestas de la lubina es de seis meses.

Si los reproductores se mantienen a fotoperiodos artificiales de adelanto, es decir fotoperiodo largo de un mes de duración, aplicado en



Abril, precedido y seguido de fotoperiodo corto constante (fig. 11 B), el animal percibe que la señal luminosa (fotoperiodo largo en Abril) aparece por detrás del tiempo real que es el solsticio de verano (21 de junio). En consecuencia, el animal tiene que realizar avances correctivos, en la fase de los ritmos reproductores, para compensar este retraso de la señal inductora y el resultado final es un adelanto real de

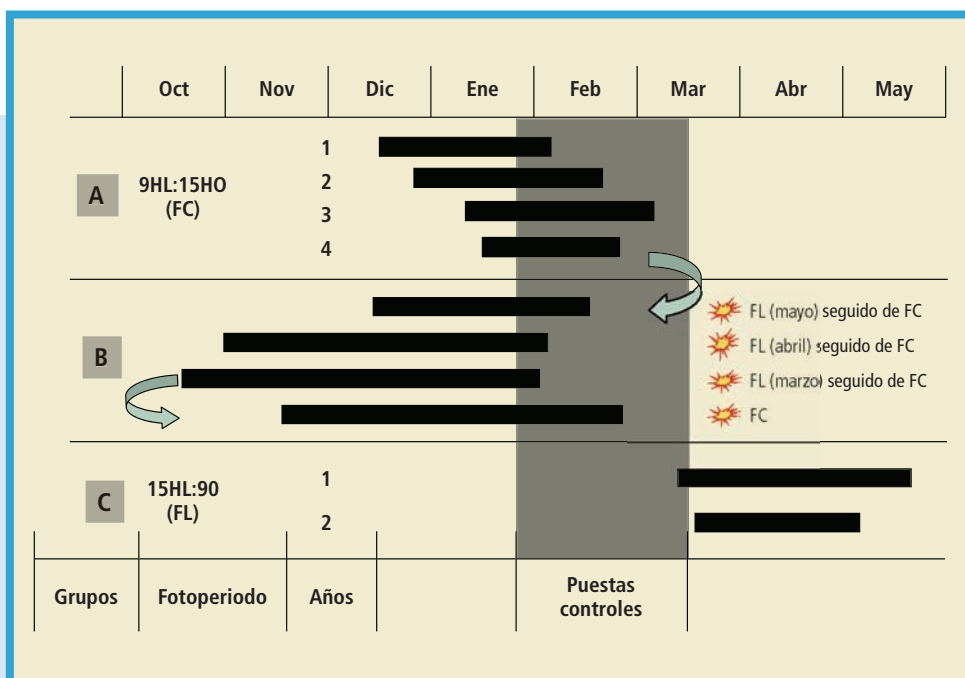


FIGURA 10.

A) Periodo de puesta de las hembras (barras negras horizontales) expuestas a fotoperiodo corto constante (FC; 9HL:15HO) durante 4 años consecutivos. B) Períodos de puesta de hembras expuestas a fotoperiodos aceleradores consistentes en un mes de fotoperiodo largo (FL; 15HL:9HO, en Mayo, Abril o Marzo), precedido y seguido de fotoperiodo corto. Aplicado a los grupos experimentales que exhibían ritmos endógenos de reproducción como señales inductoras para el encarrilamiento de los ritmos. Se indica también la época de puestas de los animales expuestos nuevamente a FC constante después del último tratamiento con fotoperiodos aceleradores. C) Periodo de puesta de hembras expuestas a FL constante durante dos años consecutivos. La época de puesta de los controles se representa con una barra vertical de color gris.

(Modificado de Carrillo *et al.*, 1995a).



la época de puesta. En definitiva, se trata de conservar el intervalo de seis meses transcurridos entre la señal luminosa y el comienzo de las puestas. Cuando los reproductores se exponen a regímenes fotoperiódicos de retraso, es decir aplicación de fotoperíodos largos por delante de la época del solsticio de verano (p. ej. en Septiembre) precedidos y seguidos por fotoperíodos cortos constantes, se produce un retraso de las puestas (fig. 11 C). El animal percibe que la señal luminosa aparece por delante del tiempo real (solsticio de verano) y por tanto, tiene que realizar atrasos correctivos de la fase del ritmo reproductor.

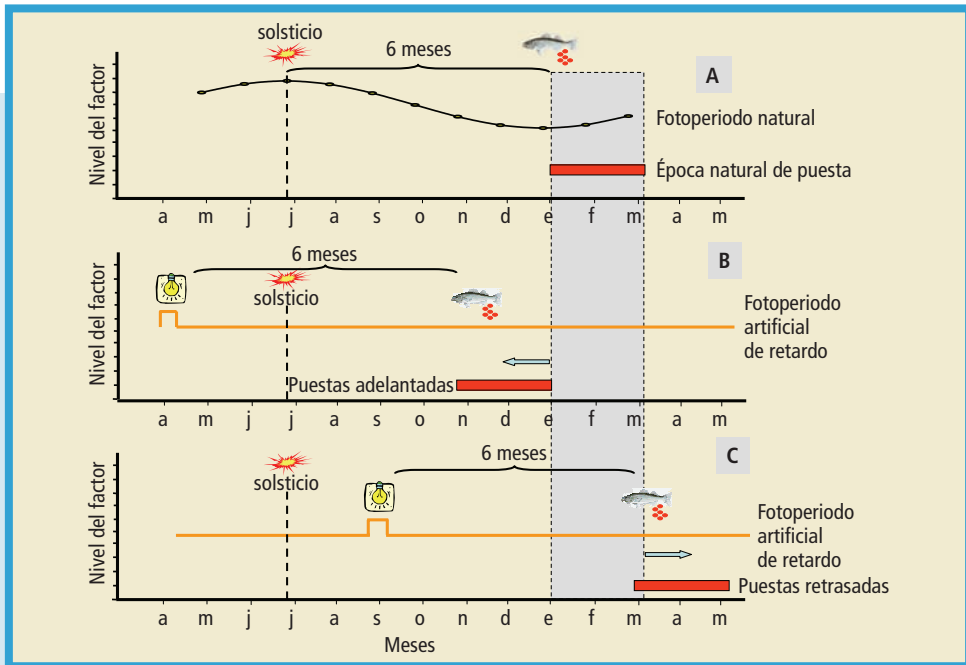


FIGURA 11.

Mecanismos de adiestramiento de los ritmos endógenos por el fotoperíodo. A) grupo control expuesto a fotoperíodo natural. El solsticio de verano se considera como la señal que encarrila los ritmos endógenos de reproducción y la señal de referencia hasta la aparición de las primeras puestas. B) Ritmos endógenos encarrilados por fotoperíodos largos aplicados antes del solsticio de verano. Las puestas se adelantan proporcionalmente al adelanto del fotoperíodo inductor. C) Ritmos endógenos encarrilados por fotoperíodos aplicados por delante del solsticio de verano. Las puestas se retrasan de forma proporcional al retraso inducido por el fotoperíodo.



3.5.1.4. Comprobación de estos mecanismos en un caso concreto

Los resultados que ilustran el adiestramiento de los ritmos endógenos del comportamiento reproductor de la lubina por la aplicación de fotoperíodos constantes, provienen de Carrillo *et al.* a (1995) y Mañanós *et al.* (1997) y se indican a continuación:

Se estabularon reproductores de lubina en tanques de 2000l de capacidad y se expusieron a fotoperiodo acelerador (fotoperiodo largo en Marzo; el resto del tiempo en fotoperiodo corto), fotoperiodo de retardo (fotoperiodo largo en Octubre; el resto del tiempo en fotoperiodo corto) y fotoperiodo natural simulado (40 °LN) o grupo control (fig. 12).

El grupo control mostró el periodo medio de puesta en el mes de Febrero y presentó un pico de E_2 plasmático en Enero con niveles elevados durante el periodo de puesta (mediados de Enero-principios de Marzo). La exposición a fotoperiodo acelerador, adelantó el perfil de variación del E_2 plasmático con un primer pico transitorio en Agosto y otro mayor y significativo en Diciembre. La época de puesta también se adelantó de manera significativa, mostrando la media a mediados de Noviembre, es decir, tres meses y medio antes que el grupo control. El grupo expuesto a fotoperiodo de retardo presentó un pico de E_2 en Marzo y la época media de puesta a mediados de Marzo con un retraso de un mes y medio respecto a la media del grupo control. Estos resultados muestran claramente que los distintos fotoperíodos, al actuar como dadores de señales ambientales, afectan a los niveles y a las fases de los ritmos hormonales que asimismo, son de naturaleza endógena. En consecuencia, así se logra alterar la temporalidad de las fases finales del proceso reproductor como la maduración y la puesta.

3.5.1.5. Conclusiones

1. Los mecanismos endógenos subyacentes en los procesos reproductores son responsables de la temporalidad de estos eventos dado que funcionan como relojes endógenos.
2. El estímulo fotoperiodico actúa como sincronizador de las fases de los ritmos endógenos y no como un efecto inductor del proceso reproductor.



- La existencia de los ritmos endógenos permite comprender mejor los mecanismos involucrados en el encarrilado de los ritmos biológicos inducidos por el fotoperiodo

3.5.2. Ritmos circadianos

Un reloj biológico para funcionar adecuadamente, necesita de un sistema de salida que lleve la señal a las zonas diana y gobierne de forma manifiesta

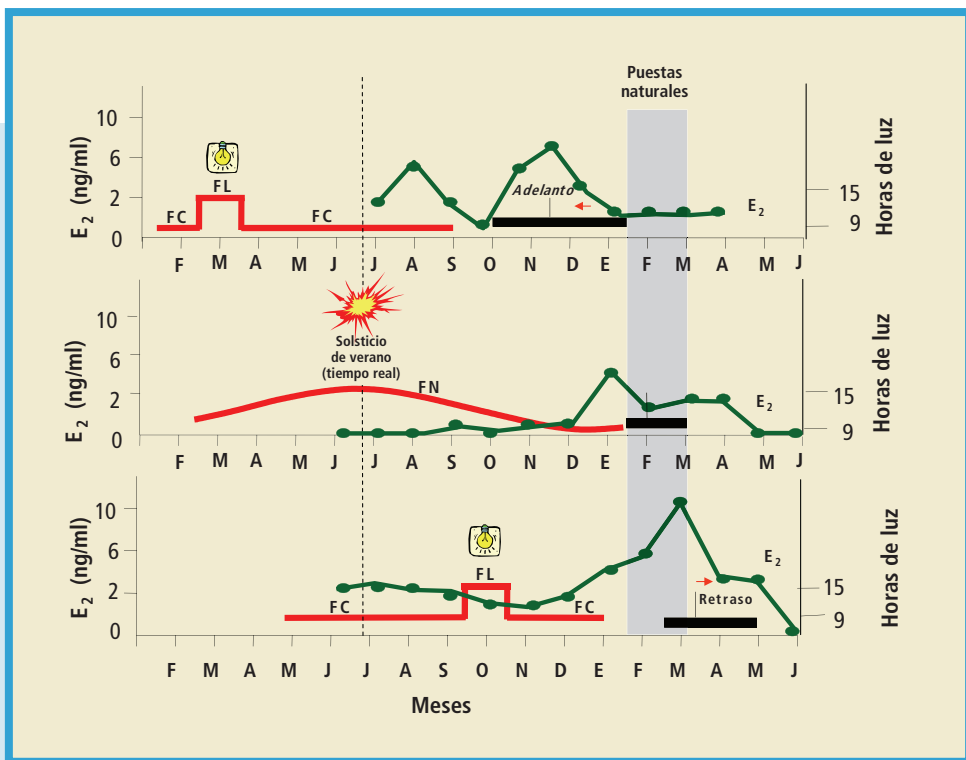


FIGURA 12.

Efecto de los fotoperiodos constantes aceleradores (FL en Marzo el resto del tiempo en FC) y los de retardo (FL en Octubre, el resto del tiempo en FC) sobre los niveles plasmáticos de 17 β -estradiol y la época de puestas de hembras de lubina. Las barras horizontales gruesas indican el periodo de puesta de los distintos grupos experimentales y las líneas verticales de trazos, el periodo medio de las mismas. La barra vertical gris, indica el periodo de puesta del grupo control. FL = Fotoperiodo largo; FC = fotoperiodo corto; FN = Fotoperiodo natural. (Modificado de Carrillo *et al.*, 1995a y Mañanós *et al.*, 1997).



a los ritmos, una vía de entrada para la sincronización y el marcapasos. Todo esto constituye el sistema circadiano y su organización es específica de cada organismo. Los componentes clave en los vertebrados son los ojos laterales, el núcleo supra-quiasmático del hipotálamo y el órgano pineal (Takahashi, 1995). En los peces, la existencia de una estructura centralizada a modo de reloj central neuronal, análogo al núcleo supra-quiasmático de los mamíferos, todavía no ha sido documentada. De todas maneras, la retina y la pineal también pueden contener osciladores circadianos. El órgano pineal posee células fotorreceptoras que desempeñan un papel importante en la ritmicidad circadiana vía secreción periódica de melatonina y la retina, que también produce melatonina, generaría más bien una señal local de tipo paracrino. En consecuencia, la retina y la pineal pueden concentrar todos los constituyentes necesarios de un sistema circadiano, esto es el reloj, las vías aferentes y las eferentes (Falcon, 1999). Para los peces la melatonina es un indicador fiable porque les permite averiguar en qué momento del día se encuentran, dado que producen melatonina durante la noche y dejan de hacerlo durante el día. Además, en los peces al ser poiquiloterms, la temperatura también modula la cantidad de melatonina producida durante la noche, liberándose más melatonina en verano que en invierno. De esta manera, la melatonina se convierte en una señal estacional para los peces pues en invierno, cuando las noches son largas y las temperaturas bajas, se produce melatonina durante más horas. Por el contrario en verano, al presentar noches cortas y temperaturas elevadas, se produce melatonina durante menos horas. Datos recientes (M Bayarri, J Falcon, S Zanuy, M Carrillo, resultados no publicados) muestran que la lubina presenta una correlación inversa entre temperaturas y niveles de melatonina. De esta manera los peces disponen de un sistema muy eficiente para medir el tiempo que les permite distinguir las noches y los días y saber, con precisión, en qué estación del año se encuentran. Estos aspectos han sido revisados recientemente de forma exhaustiva por Zhdanova y Reebbs (2005).

3.6. ENLACE FOTO-ENDOCRINO DEL PROCESO REPRODUCTOR

Veamos más en detalle los aspectos comentados anteriormente para esclarecer un poco mejor el enlace foto-endócrino del proceso repro-



ductor. La transducción de la información lumínica procedente del fotoperiodo, considerado como un factor dador de tiempo (zeitgeber), es responsabilidad del sistema circadiano. Desgraciadamente, como ya se indicó anteriormente, la localización y caracterización de este sistema todavía no están del todo definidas en los teleósteos y entre ellos existen muchas diferencias específicas. De todas maneras, este sistema podría estar formado por la retina, por un marcapasos central y por osciladores periféricos distribuidos en otros tejidos. Además, puede haber más de un marcapaso, aunque su localización también es imprecisa.

La pineal, considerada en la mayoría de especies como el órgano principal del sistema circadiano, en vertebrados poiquilothermos (lampreas, peces y anfibios) se sitúa en la parte superior del cerebro ya que posee capacidad fotorreceptora. Además, normalmente la parte del cráneo que la protege es más fina que el resto para facilitar el paso de la luz. A medida que se avanza en la escala evolutiva, la pineal se va situando en una posición cada vez más interna del cerebro, hasta que finalmente en mamíferos aparece debajo del cuerpo calloso. Esta situación de la pineal, en una zona tan profunda del cerebro de los mamíferos, da idea de la pérdida de la capacidad fotorreceptora y la ganancia de la función glandular sufrida a lo largo de la evolución, mientras que ha cobrado importancia la información lumínica procedente de la retina.

En los peces, generalmente, la melatonina presente en plasma se produce en la pineal, aunque hay otros tejidos capaces de sintetizarla como son la retina o el tracto gastrointestinal, pero en la mayoría de especies estudiadas se considera que en estas áreas ejerce una función paracrina, sin llegar a abandonar el tejido productor.

3.6.1. Variación diaria y estacional de la melatonina

La melatonina procedente de la pineal se secreta al torrente sanguíneo únicamente durante la fase de oscuridad, por lo que actúa como reloj para el animal. De hecho, también se le conoce como «oscuridad química», ya que su presencia advierte de la llegada de la noche a aquellos tejidos sin capacidad fotorreceptora propia.

También se le atribuye función de calendario, ya que los animales son capaces de detectar, además de la duración, la amplitud del ritmo de melatonina, así como la dirección en los cambios de ambos paráme-



tros. Es decir, cuando al acercarse el invierno se acorta el fotoperiodo y la temperatura desciende, la duración de la elevación de melatonina se prolonga, y la amplitud de su ritmo aumenta (Reiter, 1993).

Como se apuntaba en el apartado anterior, las variaciones diarias y estacionales del fotoperiodo son las que inducen los ritmos circadianos y circanuales de melatonina, respectivamente. Gracias a la existencia de dichos ritmos, los reproductores estacionales programan el momento idóneo para la reproducción, es decir, aquel en el que las condiciones vayan a ser óptimas para la supervivencia de la prole.

3.6.2. Modulación de la secreción de melatonina (orientación, espectro, intensidad de luz, temperatura)

Los factores ambientales influyen por tanto en el control del sistema circadiano de los peces, concretamente sobre la producción de melatonina. El ambiente fótico acuático es muy diferente al terrestre, ya que los rayos del sol se reflejan parcialmente en la superficie, se refractan al penetrar en el agua, se dispersan y son absorbidos diferencialmente conforme pasan a través de la columna de agua. Como resultado, según aumenta la profundidad, la composición espectral de la luz solar se va alterando y atenuando en intensidad (Nicol, 1989). Las aguas oceánicas claras son mayoritariamente transparentes a la luz azul de 460-475 nm, y absorben los fotones de mayor y menor longitud de onda, que son además absorbidos y dispersados por los pigmentos disueltos y las partículas en suspensión de las aguas costeras, donde el máximo de transmisión de la luz aparece desplazado hacia longitudes de onda mayores (Nicol, 1989). Curiosamente, los fotopigmentos de los peces que habitan en diferentes ambientes fóticos (aguas profundas, costeras o continentales) muestran adaptaciones, de forma que la máxima sensibilidad se encuentra hacia las longitudes de onda disponibles en cada ambiente, aunque la respuesta está desplazada hacia longitudes de onda más cortas para las especies costeras y de aguas continentales (Lythgoe, 1980). Por lo tanto, la profundidad a la que se encuentra el hábitat de cada especie es un factor definitorio de los umbrales de intensidad y espectro lumínico necesarios para la síntesis de melatonina. Se han realizado pocos estudios acerca de cómo influye



la calidad de la luz en la secreción de melatonina en peces. El método más utilizado con este fin ha sido el de la aplicación de pulsos de luz de una hora de duración en mitad del periodo de oscuridad, de intensidades decrecientes, simulando profundidades crecientes. Este tipo de experimentos se ha llevado a cabo en una especie de teleosteo de agua dulce, el salvelino (*Salvelinus fontinalis*; Zachmann *et al.*, 1992a), y en uno de agua marina, la lubina (*Dicentrarchus labrax*; Bayarri *et al.*, 2002). En ambos trabajos se observó que conforme aumentaba la intensidad de luz del pulso aplicado, menor era la concentración de melatonina plasmática, encontrándose el umbral en una intensidad de aproximadamente $6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, equivalentes a unos 10 lux. Empleando el mismo sistema, se observó que la lubina es más sensible a la luz azul, predominante en su entorno (Bayarri *et al.*, 2002).

Por otra parte, la penetración de la luz del día en el mar es máxima en la dirección del sol (luz cenital), por lo menos en aguas someras, donde la luz aplicada hacia abajo no se distribuye igualmente en todos los azimut debido a la dispersión (Nicol, 1989). Las luces sumergibles pueden utilizarse en jaulas flotantes para aplicar fotoperiodos artificiales, pero se conoce muy poco acerca de la efectividad de dicha distribución angular de la luz. La mayor parte de los rayos solares llegan a la cabeza del pez dorsalmente (excepto los que se dispersan, que le pueden llegar lateralmente), ya que la pineal está localizada en la parte superior del cerebro y por lo tanto recibe la luz dirigida hacia abajo. El efecto de la orientación de la luz en la producción de melatonina también se ha estudiado en la lubina (Bayarri *et al.*, 2002), observando que únicamente la luz dirigida hacia abajo (imitando la forma en que incide la luz solar), consigue inhibir la secreción de melatonina plasmática tras un pulso nocturno de una hora de duración.

La temperatura del agua también influye en la producción de esta hormona, como se ha comentado anteriormente. Mientras que el fotoperiodo controla la duración de la elevación nocturna de melatonina, la temperatura controla la amplitud de dicha elevación. Esto se ha comprobado en varias especies, como lubina (García-Allegue *et al.*, 2001) y salmón del Atlántico (Randall *et al.*, 1995). Sin embargo, la pineal para poder ejercer correctamente su función de calendario



necesita disponer, en cada momento del año, de una combinación de información sobre ambos parámetros (fotoperiodo y temperatura).

3.6.3. Posible existencia de ritmos endógenos de melatonina

Cuando se realiza un estudio con el objetivo de investigar la posible existencia de ritmos endógenos de melatonina, los individuos se someten a condiciones de oscuridad constante y se determina la concentración de melatonina cada cierto número de horas. Al llevar a cabo este estudio *in vivo*, aparece la problemática de que cada animal puede mostrar una periodicidad (*tau*) diferente, por lo que las posibles oscilaciones rítmicas podrían estar enmascaradas por el efecto grupo. Por tanto, la manera alternativa de estudiar el caso sería mediante cultivo *in vitro*. La pineal de la mayoría de peces, mantenida en condiciones de oscuridad constante en cultivo *in vitro*, presenta oscilaciones rítmicas de liberación de melatonina que aunque no ocurran con un *tau* de 24 horas exactas, como sucede cuando se mantienen bajo ciclos de 12L: 12D, sí se les puede llamar circadianas (*tau* cercano a 24 horas). Esto se ha comprobado en varias especies, como el carpín dorado (*Carassius auratus*) (Iigo *et al.*, 1991), matalote (*Catostomus commersoni*) (Zachmann *et al.*, 1992b), aligote (*Plecoglossus altivelis*) (Iigo *et al.*, 2003) y lubina (Bayarri *et al.*, 2004a). Sin embargo, hay especies, como los salmónidos, en los que la liberación de melatonina se mantiene elevada a lo largo de todo el periodo de oscuridad, independientemente de la duración de éste (Gern y Greenhouse, 1988). Por tanto, el que en la pineal exista o no un marcapasos es un factor especie-dependiente.

3.6.4. Evidencias recientes del papel de la melatonina en la reproducción de los teleósteos

Todos los procesos de comportamiento diario en peces como la alimentación, actividad motora y consumo de oxígeno, por ejemplo, vienen determinados por la influencia de los factores ambientales. La alternancia del día y la noche desempeña un papel crucial en la sincronización de estos ritmos. Los peces también se han adaptado a



los cambios anuales de estos factores externos, de manera que funciones fisiológicas como el crecimiento o la reproducción muestran una periodicidad anual (Falcón *et al.*, 2007). La pineal es el órgano responsable de la transducción de la información lumínica en melatonina. Esta hormona viaja, siempre durante la fase de oscuridad, por el torrente sanguíneo hasta sus tejidos diana, distribuidos por todo el organismo, además de ejercer su acción en partes concretas del cerebro. En especies como la lubina la presencia de una alta densidad de receptores de melatonina en aquellas áreas cerebrales con un papel relevante en la función de reproducción, como el hipotálamo, donde residen las neuronas productoras de GnRH, da idea de la estrecha relación entre ambas (Bayarri *et al.*, 2004c). Sin embargo curiosamente, no se han encontrado sitios de unión de melatonina en el techo óptico, hipotálamo y cerebelo de *Coryphaenoides armatus*, una especie de teleosteo de aguas profundas que no recibe ninguna señal de la luz solar (Smith *et al.*, 1996). Por otra parte, al someter a grupos de lubinas a un fotoperiodo largo (18HL: 6HO), se han observado ritmos diarios de hormonas como la sbGnRH hipofisaria y la LH plasmática, dependientes del fotoperiodo (Bayarri *et al.*, 2004b). De esta manera queda patente la existencia de una influencia más o menos directa de la melatonina en la parte superior del eje hipotálamo-hipófisis-gónada de los peces teleosteos. Una información más detallada de todos estos aspectos la proporciona J. A. Muñoz Cueto en el capítulo 1 de este mismo libro.

3.7. APLICACIONES DEL FOTOPERIODO A LA ACUICULTURA

3.7.1. Manipulación de la época de puesta para obtener puestas todo el año

La aplicación más obvia del uso del fotoperiodo en acuicultura es la capacidad de alterar la época natural de puesta de los peces de importancia comercial (generalmente restringida a periodos muy cortos de tiempo), para alcanzar una producción continua a lo largo del año. Los criaderos necesitan producir de forma continua huevos y larvas de peces para satisfacer las demandas, siempre crecientes de las piscifactorías, quienes nece-



sitan producir peces de talla comercial a lo largo del año para el consumo humano. Con el fin de desarrollar un diseño fotoperiodico apropiado para modificar el tiempo de puesta, de una especie en particular, se necesita disponer de información del momento del año en el que se inicia el proceso reproductor y ocurre la puesta. Los estudios con stocks de reproductores de una variedad determinada, realizados en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura, en una latitud específica, han permitido correlacionar los diferentes estadios de maduración gonadal con las diferentes fases de un ciclo anual de luz y así, sentar las bases de la manipulación fotoperiodica. Por otro lado, es muy importante implementar los materiales y dispositivos adecuados para el éxito de la inducción fotoperiodica. Uno de los aspectos esenciales de la manipulación fotoperiodica, en granjas acuícolas, es el ajuste del tiempo para producir gametos fuera de la época natural de puesta. Para ello se precisan instalaciones protegidas que eviten filtraciones de luz y provistas de iluminación artificial controlada por relojes temporizadores. Generalmente se pueden usar lámparas de tungsteno o fluorescentes que emitan un espectro lumínico similar a la luz natural, con intensidades de al menos 100 lux en superficie, en todas las áreas de la instalación, evitando utilizar intensidades menores. Aunque, los incrementos o disminuciones progresivas de luz no son esenciales para la respuesta fotoperiodica, si lo son para reducir el estrés que provoca el encendido o apagado brusco de las luces. En consecuencia, para un control integral del proceso inductor, es preciso implementar reóstatos en los relojes temporizadores que controlan las luces incandescentes, para simular crepúsculos o auroras. Para el caso de las lámparas fluorescentes, es importante añadir un segundo sistema de luces más atenuadas que se enciendan poco antes o después del encendido o apagado de éstas lámparas. Finalmente, la manipulación fotoperiodica debe acompañarse de la manipulación térmica correspondiente simulando las temperaturas naturales que varían a lo largo del año, utilizando generalmente sistemas de intercambiadores de calor.

3.7.2. Ejemplo del control ambiental de la reproducción de la lubina en una empresa acuícola

Algunas piscifactorías utilizan pozos de agua marina que les proporciona agua filtrada a temperatura constante. En este tipo de instalaciones, el uso de intercambiadores de calor, para calentar o enfriar el agua



a voluntad es ideal, pues permite ahorrar energía ya que el salto térmico es menor que cuando se trata de calentar o enfriar artificialmente agua procedente del medio natural, sujeto a mayores variaciones estacionales de temperatura. Generalmente, se adecuan tanques de fibra de vidrio u otros materiales con capacidad superior a 3.000 l a circuito abierto, dotados con lámparas reguladas por relojes temporizadores y aislados lumínicamente. Una vez dispuestos los sistemas físicos de estabulación, los pasos siguientes son la selección y organización del stock de reproductores en función de su origen, edad (la óptima, p.e. 4-6 años), proporción de sexos, previamente identificados y marcados individualmente a ser posible con pit-tags y finalmente el diseño experimental. En este caso particular que nos ocupa, se organizaron doce grupos de 30 individuos cada uno, expuestos a fotoperiodos y temperaturas constantes, convenientemente desplazados, para conseguir puestas a lo largo de todo el año. La experiencia duró tres años consecutivos manteniendo las mismas condiciones iniciales de trabajo. En teoría, las puestas se esperaban seis meses después de la administración del cambio fotoperiodico (de largo a corto constante), coincidiendo con la bajada artificial de temperaturas ($<15^{\circ}\text{C}$), que generalmente se iniciaba un mes antes de que tuvieran lugar las primeras puestas. Más específicamente, si el cambio fotoperiodico se administraba en Abril, la puesta se esperaba en el mes de Octubre con temperaturas por debajo de los 15°C administradas en Septiembre y así sucesivamente a lo largo del año. Con ello se esperaba obtener puestas todos los meses, provenientes de cada uno de los doce grupos experimentales. En un principio, al primer año, los resultados mostraron que aproximadamente un poco menos de la mitad de los grupos respondieron a los tratamientos con una fecundidad y calidad de huevos muy irregular. Al segundo año, prácticamente la totalidad de los grupos respondieron, pero la fecundidad y calidad de los huevos también fue muy variable. Finalmente al tercer año, todos los grupos sin excepción pusieron, regularizando notablemente los valores de la fecundidad y supervivencia de huevos y larvas. Respecto a la época de puesta también se observaron diferencias entre la esperada y la observada, que se fueron reduciendo con el transcurso de los años. Desde el punto de vista de la producción, la cantidad de huevos producida el primer año alcanzó los 20 millones de huevos viables, doblando



la producción al tercer año. Igualmente las tasas de eclosión que en el primer año alcanzaron el 30 % doblaron sus valores al tercer año. Finalmente, la producción de larvas de lubina que empezó con 10,6 millones al primer año, aumentó en 2,4 veces en el segundo año (25,2 millones) (fig. 13).

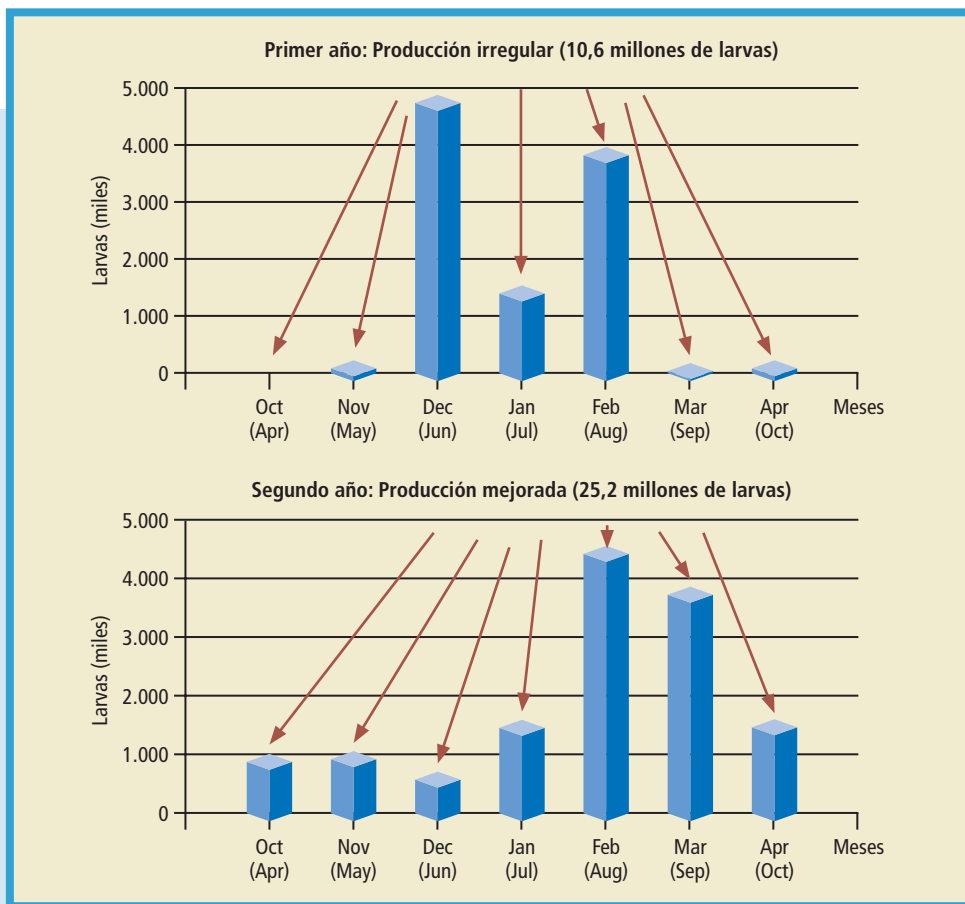


FIGURA 13.

Efecto de la aclimatación a largo plazo de varios grupos de reproductores de lubina, sometidos a fotoperiodos y termoperiodos desfasados, sobre la producción de larvas en condiciones industriales. Los meses representan la época en que se obtuvieron las puestas y los meses en paréntesis la época en que se aplicó el cambio fotoperiodico (de largo a corto). (Carrillo, Zanuy, Crespo, Dos Santos, Vidaurreta. Resultados no publicados).



3.7.3. Conclusiones

1. La exposición a cambios fotoperiodicos realizada en momentos determinados del año permite sincronizar, de manera muy sensible y precisa, la temporalidad de los ciclos reproductores logrando alterar los procesos de maduración y puesta de los peces. De esta manera, se pueden obtener puestas todos los meses del año.
2. Para alcanzar una producción óptima de huevos y larvas a lo largo del año, en grupos de reproductores expuestos a regimenes combinados de luz y temperatura constantes, se necesita que estén adaptados a estas condiciones, al menos, durante tres años consecutivos. Los parámetros investigados que sufrieron más variaciones fueron los siguientes:
 - Una reducción significativa de la desviación temporal entre las puestas observadas y esperadas
 - Un incremento de la fecundidad
 - Una mejora sensible de la calidad de los huevos y de las larvas
 - Un incremento neto de la producción masiva de larvas viables
 - Una mejora general del comportamiento reproductor.

3.7.4. Inhibición o retraso del proceso reproductor para mejorar el crecimiento

Ante la provisión limitada de recursos energéticos, los organismos no pueden diversificarlos para satisfacer dos o más funciones a la vez, como sucede con la reproducción o el crecimiento. En consecuencia, el organismo deja de crecer cuando se reproduce y viceversa. De esta manera se ha comprobado en muchas especies de teleosteos cultivados que el inicio de la maduración conlleva una disminución importante de la tasa de crecimiento que se mantiene durante el período reproductor. Esta reducción del crecimiento durante la época de puesta alarga el tiempo requerido para alcanzar el tamaño comercial. Este principio ha sido el referente en acuicultura para buscar metodologías capaces de inhibir o retrasar artificialmente el proceso reproductor para favorecer el de crecimiento. La administración de fotoperiodos artificiales en instalaciones en tierra, provistas de cerramientos, ha sido muy eficaz en el control de la época de puesta. Por ejemplo, la administración de



fotoperíodos largos constantes a lubinas mantenidas en tanques con aislamiento lumínico provocó un retraso de la onda madurativa gonadal y un aumento significativo del peso y talla corporales respecto al control (Rodríguez *et al.* 2001b). Sin embargo, para los grandes estanques en tierra o para las jaulas flotantes el aislamiento lumínico no es posible. Los trabajos pioneros de Bromage (Bromage *et al.* 2001) utilizaron regímenes de luz continua (LL), súper-impuestos al fotoperiodo natural, para retrasar las puestas de truchas mantenidas en tanques sin aislamiento lumínico. Posteriormente se aplicaron regímenes similares a salmones (Hansen *et al.*, 1992) y bacalao (Taranger *et al.*, 2006) mantenidos en jaulas flotantes. Generalmente, la aplicación de LL a partir del verano en adelante causa un retraso del desarrollo gonadal y un incremento del crecimiento somático.

3.8. CONTROL DE LA PUBERTAD

3.8.1. Introducción y conceptos

Uno de los grandes misterios de la biología de los vertebrados es conocer las causas responsables del inicio de la pubertad. La pubertad, un proceso que en los teleosteos se produce algún tiempo después de la diferenciación sexual, es la causante de que un animal inmaduro adquiera la capacidad de reproducirse. Al inicio de este proceso aparecen, por primera vez, espermatozoides en los machos y oocitos vitelogenéticos en las hembras, culminando al final con la primera espermiación y ovulación en los machos y en las hembras, respectivamente (Strüssmann y Nakamura 2002; Schulz y Miura 2002; Patiño y Sullivan 2002). En muchas especies de teleosteos se ha observado maduración prematura de los machos un año antes de alcanzar la verdadera pubertad. Esta maduración prematura se caracteriza por una gametogénesis incompleta o desarrollo gonadal tentativo (Begtashi *et al.*, 2004) y niveles elevados de GnRH en cerebro e hipófisis y LH en hipófisis y plasma durante la época de puesta (Amano *et al.*, 1997). En la figura 14 se ilustra, de manera esquemática, la cronología de la pubertad en la lubina y de sus definiciones, que también podría aplicarse como mo-



delo para aquellas especies gonocoristas en las que el macho alcanza la pubertad antes que la hembra.

3.8.2. Importancia

En los peces, como en otros vertebrados, los mecanismos que subyacen a la pubertad y más concretamente a su inicio, no están del todo claros. Por ello el conocimiento adquirido con el estudio del proceso de

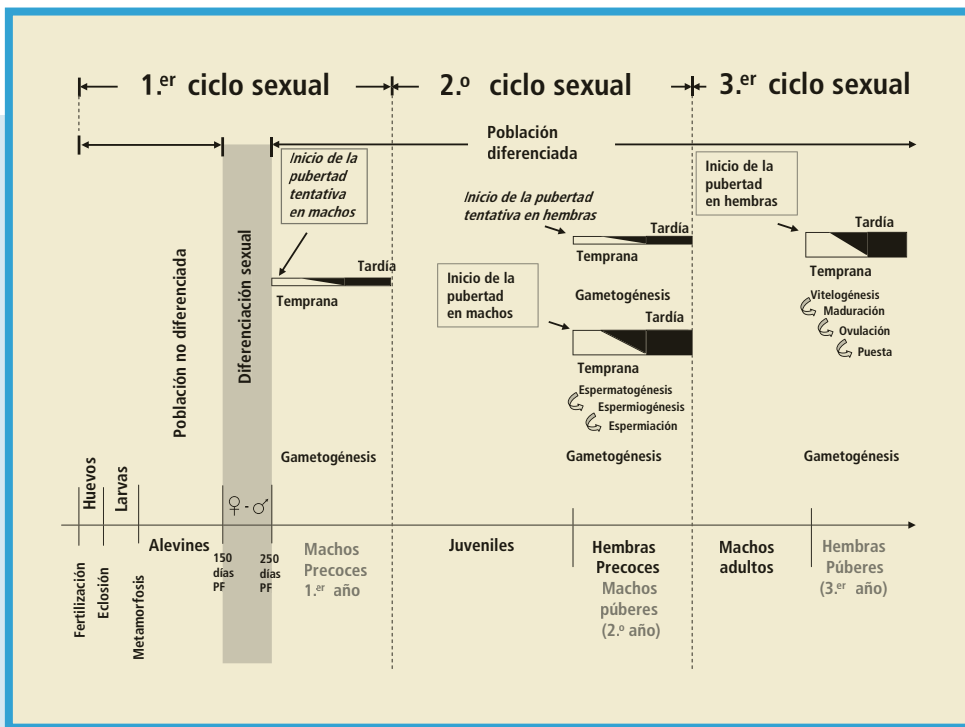


FIGURA 14.

Representación esquemática de la cronología de la pubertad y sus definiciones en teleósteos, con especial referencia a las especies en las que el macho alcanza la pubertad antes que la hembra. En los machos el inicio de la pubertad se caracteriza por la puesta en marcha de la espermatogénesis y comprende una fase inicial en la que aparecen los espermatoцитos y una fase avanzada en la que tiene lugar la espermiogénesis (formación del espermatozoide) y la espermiación (liberación del esperma). En varias especies de teleósteos se produce una activación temporal del eje cerebro-hipófisis un año antes de la pubertad que da origen a una maduración tentativa o parcial de los machos, apareciendo los precoces (dummy run).



pubertad y su control es muy importante, tanto en biología básica de la reproducción de los peces, como aplicada a su cultivo. En este último aspecto, por ejemplo, en el caso de los esturiones, meros y atunes que necesitan varios años para alcanzar la pubertad, si se acelerara el inicio de la misma para obtener huevos en el tiempo deseado, los costes de estabulación de los ejemplares en las piscifactorías se reducirían. A la inversa, un desarrollo gonadal precoz conlleva crecimientos pobres y un deterioro de la calidad de la carne como ocurre en salmónidos, carpas, lubina y bacalao. En estas especies es conveniente suprimir o retrasar la pubertad para permitir un crecimiento somático adecuado del animal. Los mecanismos y factores que regulan la pubertad en los teleósteos han despertado gran interés entre los investigadores y han sido objeto de varias revisiones y estudios (Goos, 1993; Dufour *et al.*, 2000; Schultz y Goss, 1999; Cavaco *et al.*, 2001a, b; Zanuy, *et al.*, 2001; Okuzawa, 2002; Cambell *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.* 2005; Nocillado y Elizur, 2007; Carrillo *et al.* 2007a; 2008c). A pesar de ello, todavía son más los interrogantes que las respuestas obtenidas para esclarecer la regulación y el control de la pubertad en los teleósteos.

3.8.3. Cambios en el eje cerebro-hipófisis-gónadas durante la pubertad

Cada vez se tiene más evidencias de que el inicio de la pubertad no es consecuencia de un factor único, sino que la puesta en marcha de este proceso podría ser la consecuencia de la contribución de un conjunto de factores genéticos, señales metabólicas (p.ej. estatus energético) y estímulos ambientales (Parent *et al.*, 2003; Ojeda *et al.*, 2005; Nocillado *et al.*, 2007). Cualesquiera que sean los factores últimos determinantes del inicio de la pubertad, la señal integradora derivada de ellos sería la liberación de GnRH a cargo de las neuronas hipotalámicas. En los teleósteos, como ocurre en otros vertebrados, el proceso reproductor incluyendo la pubertad, está regulado por una cascada hormonal a lo largo del eje CHG. Esto hace suponer que el inicio de la pubertad está acompañado por una activación de todo este eje. En los mamíferos, el inicio de la pubertad está caracterizado por una secreción pulsátil de la GnRH que activa la biosíntesis y secreción, también pulsátil, de las gonadotrofinas (LH y FSH). Éstas, a su vez, estimulan



la función gonadal incluyendo la gametogénesis y la síntesis de esteroides gonadales. Como consecuencia, durante la pubertad las gónadas alcanzan una maduración y funcionalidad completas (Grumbach, 2002; Ojeda y Skinner, 2005). En los teleósteos, no hay información sobre los modelos de secreción de GnRH a pesar de que éste juega un papel clave en la coordinación de los eventos reproductores ya establecido desde hace algunas décadas (Schally *et al.*, 1973). Ello es debido a la dificultad inherente de medir los perfiles de secreción de GnRH ya que no existe un sistema portal como en los mamíferos. En consecuencia, en los teleósteos, todavía se desconocen muchos detalles del mecanismo exacto, responsable del inicio de la pubertad en el eje CHG. De todas maneras, lo que sí parece probable es que la activación del sistema GnRH, al igual que sucede en los mamíferos, podría estar controlada por una red jerárquica de genes extraordinariamente sensible a las diferentes señales endógenas y ambientales que interacciona con los reguladores centrales para definir con exactitud el inicio de la pubertad. La comprensión de los mecanismos responsables del control fisiológico del eje reproductor y en particular de la pubertad recibió un impulso considerable a partir de 2003 (de Roux *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003) con la identificación del papel fundamental de las kisseptinas (productos peptídicos del gen Kiss-1 tales como la kisseptinas 54, 14, 13 o la 10) y de su receptor putativo, el GPR54. Actualmente el sistema Kiss-1/GPR54 se considera como el custodio de la función de la GnRH que permite la integración de las señales centrales y periféricas. En consecuencia, este sistema desempeña un papel central en el control de la función reproductora, incluyendo la habilidad de las kisseptinas de activar directamente a las neuronas GnRH para inducir la secreción de GnRH y potenciar la liberación de las gonadotrofinas en varias especies de vertebrados superiores (Tena-Sempere, 2006). Las neuronas kisseptina podrían actuar como procesadores centrales para retransmitir las señales provenientes de la periferia a las neuronas GnRH. De esta manera, las neuronas kisseptina podrían ser la diada directa de los esteroides gonadales, estando involucradas en la regulación de los mecanismos de retroalimentación positiva o negativa de la secreción de gonadotrofinas. También se considera que podrían recibir información de la disponibilidad de las reservas energéticas



a través de la leptina, una citoquina secretada por el tejido adiposo (Smith, 2008). Finalmente, además, podrían recibir estímulos provenientes del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y de las señales ambientales como el fotoperiodo vía núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Dungan *et al.* 2006). A pesar de la importancia del sistema KiSS-1 y de ser considerado como el activador más potente del eje CHG con un papel central en la regulación de la pubertad en mamíferos, su papel sobre el control de la reproducción en vertebrados inferiores es casi desconocido. Sólo muy recientemente se han identificado las secuencias de cDNA del gen kiss-1 en seis especies de teleósteos: *Tetraodon*, fugu, medaka, lamprea, pez cebra (vanAerle *et al.*, 2008) y lubina (Felip *et al.*, 2008a) así como la distribución de las neuronas que expresan KiSS-1 mRNA en el cerebro de medaka (Kanda *et al.*, 2008). En otras especies como tilapia, mujil, cobia, lenguado, pez zebra, corvina, *Pimephales* y lubina (Parhar, *et al.*, 2004; Nocillado *et al.*, 2007; Mohamed, *et al.*, 2007; Filby *et al.*, 2007; Mechaly *et al.*, 2007; Felip *et al.*, 2008b) se ha clonado el receptor del las kisspeptinas el GPR54. Estos resultados muestran que existe un alto grado de conservación en las secuencias aminoacídicas, que apoya que el sistema Kiss-1/GPR54 está conservado a lo largo de la evolución de las especies. El hecho de que en tilapia, cobia, mugil y *Pimephales* se haya observado una variación conjunta de la expresión del GPR54 y de las diferentes formas de GnRH, particularmente de la forma GnRH 3 (considerada como la forma hipofisotropa en peces), durante la pubertad apoyan el papel preponderante que tiene el sistema Kiss-1/GPR54 sobre este proceso, al igual que en mamíferos (Mohamed *et al.*, 2007; Nocillado *et al.*, 2007; Filby *et al.*, 2007; Martínez-Chávez *et al.* 2008).

Además, se ha observado que los mecanismos de transcripción que regulan la expresión del GPR54 en teleósteos podrían estar influenciados por la luz (Parhar *et al.*, 2004), abriendo la posibilidad de que el sistema Kiss-1/GPR54 mediase en el control fotoperiodico de la reproducción como se ha sugerido en los mamíferos (Roa *et al.*, 2007) (fig. 15).

En la lubina, el análisis de dos secuencias completas de cDNA obtenidas de una librería de cDNA de cerebro, mostró que existen dos genes *kiss* en esta especie. Los estudios funcionales mostraron que ambas kisspeptinas (Kiss-1 y Kiss-2) estimulan la secreción de LH y FSH en



la hipófisis, siendo el Kiss-2 quien presenta una mayor actividad. Además, ambos genes mostraron una marcada expresión en el tejido gonadal y en el cerebro de la lubina púber (Felip *et al.* 2008a). Todos estos estudios ponen en evidencia que el sistema Kiss-1/GPR54 tiene papel central en el control de la pubertad de los teleósteos (Carrillo

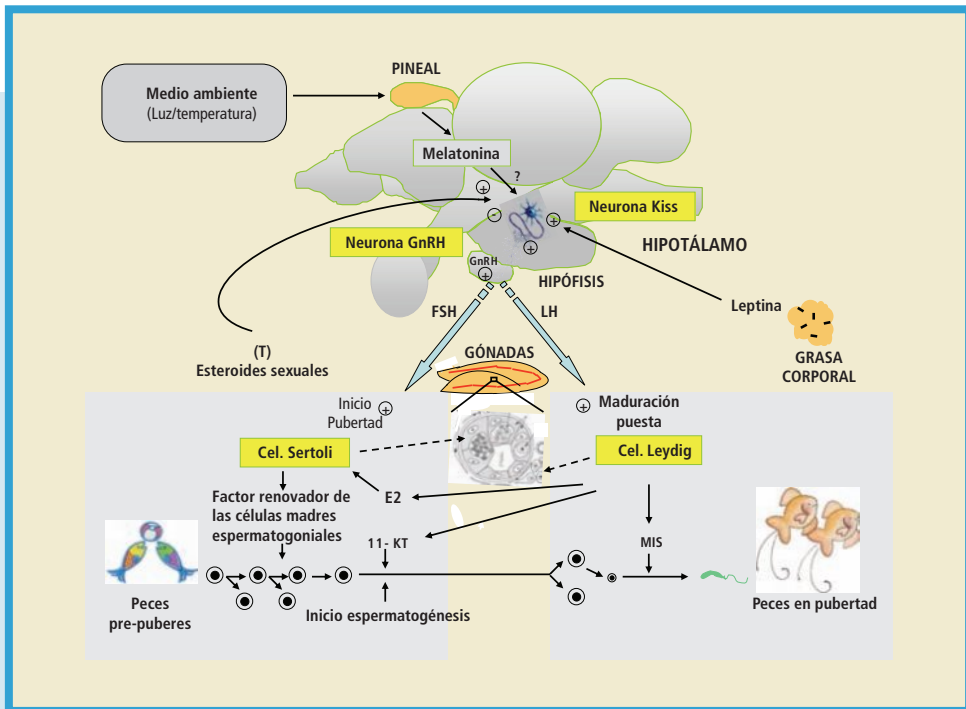


FIGURA 15.

Modelo teórico para el papel de las neuronas Kiss-1 como integradoras de la red central que controla la secreción de GnRH y el eje gonadotrópico, en peces macho que alcanzan la pubertad y su relación con el medio ambiente externo e interno. Se indican las posibles interacciones con la melatonina, como mediadora de los cambios fotoperiodicos y térmicos ambientales y con la leptina y esteroides sexuales como indicadores del status metabólico y gonadal de los peces pre-púberes. Se destaca la regulación de la gonadogénesis, en particular el papel de la FSH en las etapas iniciales de la proliferación celular e inicio de las divisiones espermatozonales y de la LH en las etapas finales de la maduración. Se sugiere una acción directa de los esteroides sexuales, de la leptina y posiblemente de la melatonina sobre el sistema hipotalámico Kiss-1, que a su vez estimula la secreción de GnRH.



et al., 2009). Además, estos mismos autores lograron clonar y caracterizar dos receptores GPR54 acoplados a la proteína G (Felip *et al.*, 2008b).

3.8.4. Determinantes internos para el tiempo del inicio de la pubertad

Los teleósteos, al ser animales poiquiloterms presentan funciones biológicas marcadamente estacionales, tales como el crecimiento y la reproducción. Generalmente, determinados períodos del año son propios de una ingesta alimenticia máxima que habitualmente coincide con los periodos de crecimiento rápido. Las tasas de ingesta y por tanto de crecimiento somático generalmente disminuyen durante el período de desarrollo gonadal, para llegar a sus valores mínimos durante la época de puesta. Este modelo inverso de la distribución anual de la ingesta y de la reproducción, común para la gran mayoría de los teleósteos, sugiere que el estatus nutricional podría estar involucrado en la modulación del eje reproductor. Recientemente, en mamíferos, se han descrito nuevas señales que integran el balance energético y la reproducción. Éstas son enviadas al cerebro a través de hormonas periféricas originadas desde el tejido adiposo, tracto gastrointestinal y el páncreas, así como por los factores metabólicos y nutricionales (Fernández-Fernández *et al.*, 2006). La leptina, una hormona secretada por los adipocitos, en proporción a la cantidad de reservas energéticas (grasa) y que funciona como un factor de saciedad en la regulación del peso, parece tener un papel importante en la señalización del inicio de la pubertad (Spicer, 2001; Tena-Sempere y Barreiro, 2002). Esta hormona no sólo indica el estado en que se encuentran las reservas energéticas del animal a los centros cerebrales que gobiernan la ingesta del alimento, sino también a los centros que rigen la función reproductora. La leptina ha sido caracterizada en endodermos desde hace mucho tiempo y sólo muy recientemente en ectodermos por lo que la evolución de su función en los teleósteos todavía casi es desconocida. De todas maneras, se ha sugerido que la leptina podría ser un regulador muy importante del sistema reproductor de los peces, al encontrar que tenía acción directa sobre la liberación de la LH a nivel hipofisario en la lubina y en la trucha (Peyon *et al.* 2001, Weil *et al.* 1999a). En cuanto a su caracterización molecular, Johnson *et al.* (2000) sugirieron que en



los peces podría estar presente un gen homólogo al de la leptina. Mas tarde, Kurokawa *et al.* (2005) identificaron un cDNA que codificaba un gen homólogo a la leptina humana en *Takifugu rubripes* y Yacovitch *et al.* (2008) purificaron y caracterizaron una leptina recombinante de esta misma especie. Por otro lado, Murashita *et al.* (2008) produjeron leptina recombinante en la trucha y finalmente, Wong *et al.* (2007) caracterizaron por primera vez en medaka, el cDNA del receptor de leptina que responde a la hipoxia. Además, se ha demostrado una relación clara entre la leptina inmunoreactiva y los niveles de estradiol durante la maduración sexual de *Plecoglossus altivelis* al tiempo de la pubertad (Nagasaka *et al.* 2006). Todos estos resultados apoyan firmemente el papel preponderante que podría tener la leptina al tiempo de la pubertad en los teleósteos. Este compuesto podría actuar como una molécula señal asociada por un lado, al estatus crecimiento/energía del animal y por otro permitiendo la puesta en marcha del proceso de la pubertad, en estrecha similitud con lo descrito en mamíferos (fig. 15).

En la dorada, se han descrito secreciones pulsátiles pre-ovulatorias de LH (Zohar *et al.*, 1988) y recientemente se han visto elevaciones nocturnas de los niveles plasmáticos de LH durante la pubertad temprana de la lubina (Bayarri *et al.*, 2004b). Estas señales hormonales fueron consideradas como anunciadoras de la puesta venidera. Sin embargo, cuando se aplica un tratamiento fotoperiódico inhibidor (p. ej. luz continua en el período sensible a la luz), los picos nocturnos de LH desaparecen y el proceso reproductor se inhibe (fig.16) (Bayarri *et al.*, 2008, 2009).

Todos estos resultados sugieren que la secreción pulsátil de LH podría ser importante para iniciar el proceso de la pubertad en la lubina. Estas secreciones nocturnas de LH en plasma se podrían comparar a las observadas en humanos, donde la secreción pulsátil de LH comienza siendo basal no pulsátil, pasa a un tren de pulsos nocturnos durante la pubertad temprana y media y desaparece al final de este período (Wu 1995). Se ha sugerido que la FSH podría tener un papel predominante en la diferenciación sexual y en etapas tempranas del desarrollo gonadal en la lubina pre-púber (Molés *et al.* 2007). La reciente purificación y caracterización de las acciones biológicas de la FSH de la lubina (Molés *et al.* 2008) han proporcionado un fuer-



te apoyo a la idea de que esta hormona podría estar actuando en etapas tempranas de la gametogénesis, promoviendo la síntesis de esteroides sexuales involucrados en la proliferación espermatogonial en los machos (Schultz y Miura 2002; Otha *et al.* 2007) y la progresión de la vitelogénesis en las hembras (Patiño y Sullivan, 2002). Sin embargo, los factores y mecanismos que regulan la señalización del incremento de FSH tanto a nivel cerebral, como hipofisario y que se suponen estar asociados con la iniciación de la gametogénesis todavía se desconocen.

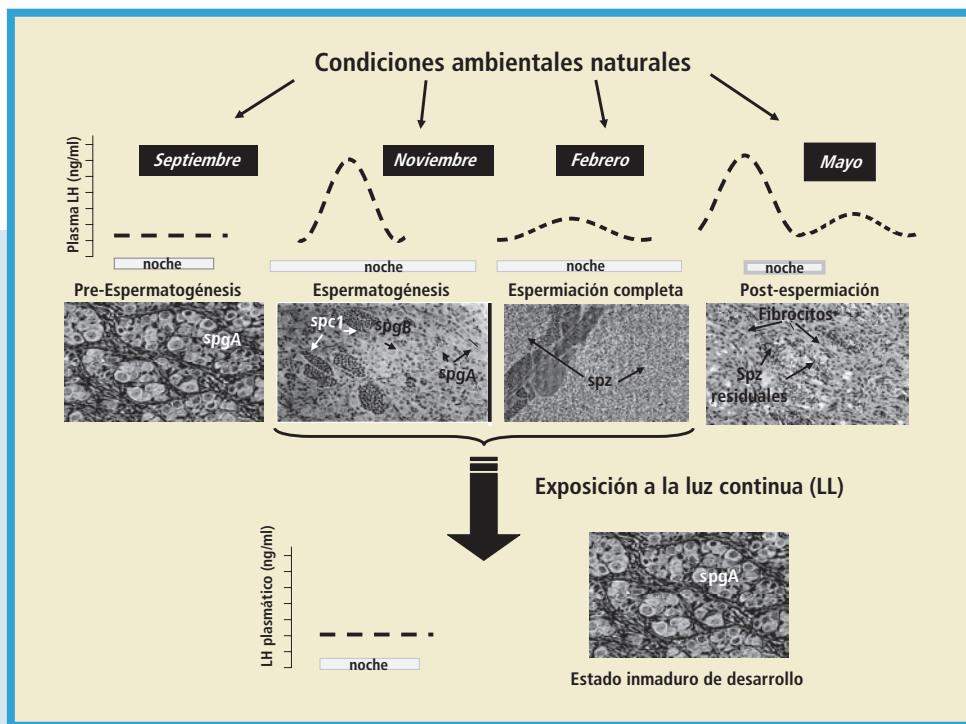


FIGURA 16.

Efecto de la administración de luz continua (LL) en diferentes épocas del año sobre la aparición de picos nocturnos de LH y el estado de desarrollo gonadal en lubinas pre-púberes. Los efectos fueron particularmente relevantes durante los meses de Noviembre (espermatogénesis) y Febrero (espermiación completa). Origen de los datos Bayarri *et al.*, (2004, 2008). Spg A: Espermatogonia A; spg B: Espermatogonia B, spc1: Espermatocitos 1, spz: Espermatozoides.



Se ha comprobado que la testosterona (T) regula negativamente la liberación de FSH de la hipófisis y actúa en las gónadas estimulando la renovación de las células germinales madre, a través de su conversión a E_2 en los machos (Miura *et al.*, 1999; Amer *et al.* 2001) y la proliferación de las oogonias en las hembras (Miura *et al.* 2007). Por su parte la 11-KT, el andrógeno más importante producido por los testículos de los teleósteos, estimula la producción de factores del crecimiento por las células de Sertoli y promueve la proliferación de las espermatogonias que conducirán a la meiosis y a las últimas etapas de la espermatogénesis (Miura *et al.*, 1991). Se ha sugerido también que la 11-KT podría ejercer una regulación efectiva sobre los mecanismos de retroalimentación positivos de los niveles de expresión del sbGnRH en el cerebro de la dorada japonesa, desempeñando un papel importante en los ciclos reproductores de los machos (Okuzaba 2002). Estos hechos apoyarían la posibilidad de que los esteroides sexuales actúen como reguladores del sistema neuronal GnRH en los teleósteos. Además, hay una serie de evidencias que sugieren la posibilidad de considerar a la 11-KT como un candidato firme en la regulación del inicio de la pubertad de los teleosteos (Cavaco *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.* 2005). Mas específicamente, la 11-KT (no la T) fue capaz de re-iniciar la espermatogénesis y promover la espermiación en machos pre-púberes de lubina expuestos a fotoperiodos inhibidores de la gametogénesis (LL). Además, éstos animales mostraron aumentos significativos de la expresión génica de las sub-unidades de las dos gonadotrofinas y de los niveles de LH plasmático, sugiriendo que la 11-KT juega un papel clave en el control de la pubertad de la lubina (Carrillo *et al.*, 2007b). Otros factores tales como el factor I del crecimiento similar a la insulina (IGF-I), también podrían mediar la acción de la 11-KT (LeGac *et al.*, 1996; Nader *et al.*, 1999), así como ejercer una regulación efectiva de la GnRH (Huang *et al.*, 1998; Weil *et al.*, 1999b). Todo ello pondría de manifiesto la complejidad de los mecanismos que regulan el proceso de la pubertad en los teleósteos y la necesidad de llevar a cabo investigaciones más detalladas y completas para esclarecer estos mecanismos.

3.8.5. El control ambiental de la pubertad

Dado que actualmente no se dispone de estudios previos sobre la manipulación hormonal de la pubertad en especies de teleósteos cultivados, esta revisión se centrará únicamente, en su control ambiental



y más concretamente en el fotoperiodico. El fenómeno de la pubertad se puede considerar como un caso particular del proceso reproductor de los teleósteos juveniles que entran en su primera maduración. Se podría asumir que los mecanismos de acción y las vías neuro-endocrinas por donde circulan los impulsos provenientes del medio ambiente, presumiblemente, podrían ser las mismas que las de los adultos, ya descritas en secciones anteriores. Dicho esto, en similitud con la alteración de las puestas en los reproductores, puede ser necesario adelantar o retrasar artificialmente el inicio de la pubertad mediante el control ambiental, en función de la conveniencia del acuicultor, pero tomando siempre en cuenta la estrategia reproductora de la especie. Estudios pioneros mostraron que era posible adelantar, de manera efectiva, la época de puesta en hembras de truchas pre-púberes utilizando fotoperíodos comprimidos en tres meses, con respecto al fotoperiodo natural (Bromage, 1987). Se obtenía un efecto parecido cuando se administraban fotoperiodos largos constantes desde principios de año hasta Mayo, seguidos luego de fotoperiodos cortos constantes (Duston y Bromage, 1987). En lubinas macho prepúberes, también se ha podido comprobar que la administración de fotoperiodo comprimido en seis meses, respecto al fotoperiodo natural, adelantaba la primera maduración sexual (Rodríguez *et al.*, 2001a) y la exposición a fotoperiodo largo constante la retrasaba (Rodríguez *et al.*, 2001b; Carrillo *et al.* 2008). Actualmente, la manipulación del fotoperiodo y muy especialmente la exposición a luz continua (LL), esta convirtiéndose en una práctica operacional estándar para la industria acuícola de numerosas especies tales como el salmón del Atlántico (Opedal *et al.*, 1997; Porter *et al.*, 1999; Endal *et al.*, 2000; Taranger *et al.*, 1998; Schultz *et al.*, 2006), la lubina (Begtashi *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005), el lenguado Senegalés (García López *et al.*, 2006) o el bacalao (Dahle *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2001; Davie *et al.*, 2003, 2007; Taranger *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que la señal responsable para el reclutamiento de los individuos que entran en el ciclo de maduración sexual es la disminución otoñal del fotoperiodo. Si esta señal se enmascara con la administración de luz continua, como han demostrado recientemente Davie *et al.* (2007) con el bacalao, se obtiene una inhibición significativa de la actividad reproductora. Sin embargo, parece que existe un



período crítico, todavía por localizar, más sensible a la administración de luz continua (LL) capaz de inhibir el inicio del proceso reproductor de los peces. En otras especies, incluida la lubina, este período podría estar comprendido en algún punto entre el solsticio de verano y el de invierno e incluye toda la bajada fotoperiodica, a partir del mencionado solsticio de verano, sobre la que se centraron todos los tratamientos de LL (fig. 17). Los resultados obtenidos a partir de las experiencias con machos de lubina demostraron que la exposición de alevines de 4 meses a iluminación continua (LL), durante un ciclo completo de 12 me-

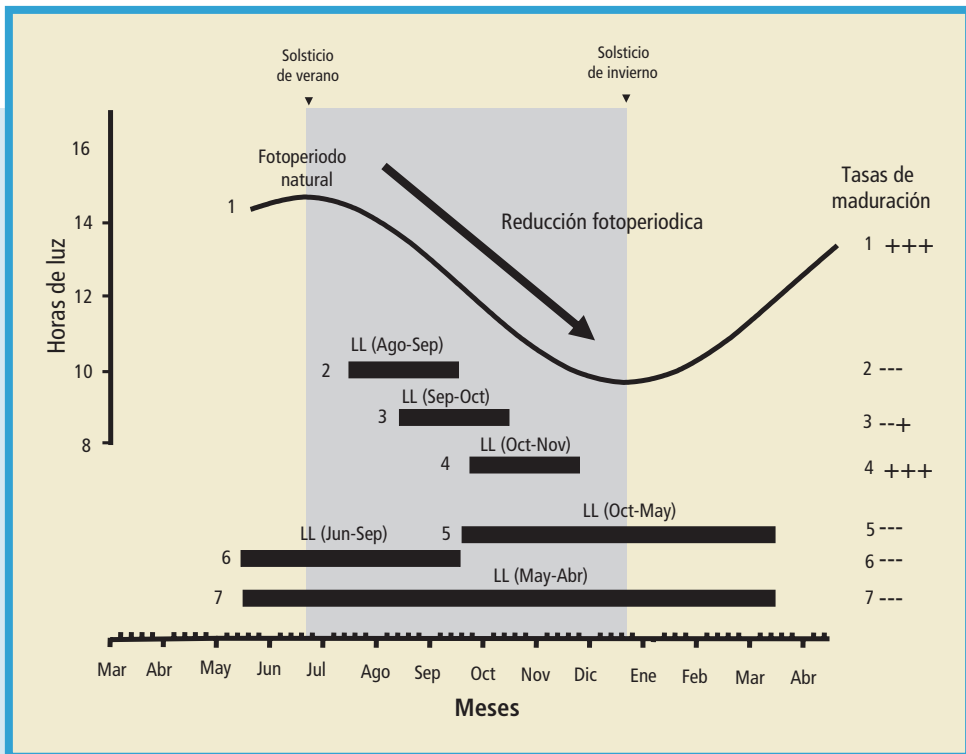


FIGURA 17.

Rastreo del intervalo de tiempo crítico para inhibir la pubertad anticipada de la lubina mediante la aplicación de ventanas de luz de distinta duración. El periodo seleccionado de rastreo estuvo comprendido entre el solsticio de verano y el de invierno. En la parte derecha de la figura se presenta el porcentaje de maduración obtenido por los diferentes tratamientos que varió entre un máximo indicado con: +++ y un mínimo representado con: ---.



ses, produjo una inhibición drástica del desarrollo gonadal prematuro (al primer año de vida). Por lo que las tasas de machos precoces disminuyeron de un 22%, observado en los controles, a valores de 0-3% presentado por los tratados con LL (Begtashi *et al.*, 2004). Felip *et al.* (2008c) aplicaron tratamientos de luz continua más cortos, de cuatro y seis meses de duración cada uno, durante la pre-gametogénesis (Junio-Septiembre) y la gametogénesis (Octubre-Mayo), respectivamente. Ambos tratamientos fueron efectivos en reducir el número de machos precoces que fue similar al obtenido por Begtashi *et al.* (2004).

Este estudio sugiere que existe un período foto-lábil que podría estar ubicado en algún lugar del punto de intersección de los dos tratamientos. Además, estos tratamientos provocaron una disminución de los niveles plasmáticos de la 11-KT y de la expresión de las subunidades de las gonadotrofinas hipofisarias, muy particularmente alteraron la expresión génica de la subunidad β de la FSH. La producción desequilibrada de este andrógeno, regulado por la FSH, podría ser limitante en la estimulación de la proliferación de las espermatogonias hacia la meiosis, a nivel testicular y así detener la pubertad temprana de la lubina.

Actualmente se está acotando aún mas el supuesto período fotosensible utilizando ventanas de luz continua de tres meses de duración con resultados muy relevantes (Carrillo *et al.*, 2008). Los resultados preliminares apuntan a que el período fotosensible podría estar localizado hacia finales de verano-principios de otoño, coincidiendo con la preparación e iniciación de los procesos gametogénicos de la lubina. Además, se ha podido establecer que si la señal luminosa no incide plenamente sobre el período sensible, ésta no es capaz de inhibir el proceso madurativo aunque puede modificar la fase del ritmo (Carrillo *et al.*, 2008). Estos resultados proporcionan un apoyo adicional al hecho de que la 11-KT sea una hormona clave para el control del inicio de la gametogénesis en la lubina. Además, indican que bajo el influjo de la luz se podría actuar en un período muy delimitado del ciclo sexual coincidente con el período crítico ya mencionado. El acotamiento de este periodo permitirá desarrollar investigaciones más precisas para estudiar qué genes se activan o se silencian por acción de la luz y cuales están implicados en la proliferación de las células madre espermatogoniales, en la multiplicación de las espermatogonias o en el inicio de las divisiones meióticas que llevarán a la espermatogénesis y a las etapas



finales de la maduración. En el aspecto práctico, permitirá manipular con mayor eficacia el fotoperiodo para lograr una inhibición completa de la maduración precoz de los peces que están sujetos a cultivos intensivos. Esto podría dar lugar a una mejora importante del crecimiento de los animales pre-púberes que no necesitarían diversificar sus reservas energéticas para el desarrollo precoz de las gónadas dirigiéndolas, únicamente, hacia el crecimiento somático como se ha verificado recientemente (Felip *et al.*, 2006). Esta intervención ambiental permitirá que prácticamente el 100% de la población de juveniles no desarrollen prematuramente sus gónadas y alcancen los crecimientos esperados al tiempo de su comercialización que, en ocasiones, coincide con el tiempo en que éstos alcanzan la pubertad.

AGRADECIMIENTOS

Los datos originales fueron obtenidos a través de ayudas de la Union Europea N.º Q5RS-2002-01801 (PUBERTIMING), MEC(AGL200-12470-E, AGL200500796), MICINN (AGL2006-04672) y Generalitat Valenciana (GV06/268).

BIBLIOGRAFÍA

- AMANO, M., S. HYODO, S. KITAMURA, K. IKUTA, Y. SUZUKI, A. URANO, and K. AIDA, 1995 Short photoperiod accelerates preoptic and ventral telencephalic salmon GnRH síntesis and precocious maturation in underyearling male masu salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99: 22-27.
- AMANO, M., N. OKUMOTO, and K. AIDA, 1997 Incomplete development of the brain-pituitary-gonadal axis may underlie the delay in the initiation of precocious maturation in male sockeye salmon. *Fish. Sci.* 63: 873-876.
- AMER, M. A., T. MIURA, C. MIURA, and K. YAMAUCHI, 2001 Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in Japanese hunchen, *Hucho perryi*. *Biol. Reprod.* 65: 1057-1066.
- BAGGERMAN, B., 1980 Photoperiodic and endogenous control of the annual reproductive cycle in teleost fishes. pp. 553-568 in *Environmental Physiology of fishes*, edited by M. A. Ali. Plenum Press, New York.
- BAKER, J. R., 1938 The evolution of breeding season, pp. 161-171 in *Evolution: Essays on aspects of evolutionary biology*, edited by G. R. de Beer. Oxford University Press, Oxford.



- BAYARRI, M. J., J. A. MADRID, and F. J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2002 Influence of light intensity, spectrum and orientation on sea bass plasma and ocular melatonin. *J. Pin. Res.* 32: 1-7.
- BAYARRI, M. J., R. GARCÍA-ALLEGUE, J. F. LÓPEZ-OLMEDA, J. A. MADRID, and F. J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2004a Circadian melatonin release in vitro by European sea bass pineal. *Fish Physiol. Biochem.* 30: 87-89.
- BAYARRI, M. J., L. RODRÍGUEZ, S. ZANUY, J. A. MADRID, F. J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, H. KAGAWA, K. OKUZAWA, and M. CARRILLO, 2004b Effect of photoperiod manipulation on the daily rhythms of melatonin and reproductive hormones in caged European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 136: 72-81.
- BAYARRI, M. J., M. LIGO, J. A. MUÑOZ-CUETO, E. ISORNA, M. J. DELGADO, J. A. MADRID, F. J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, and A. L. ALONSO-GÓMEZ, 2004c Binding characteristics and daily rhythms of melatonin receptors are distinct in the retina and the brain areas of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Brain Res.* 1029: 241-250.
- BAYARRI, M. J., S. ZANUY, *et al.* O. YILMAZ and M. CARRILLO, 2008. Ritmos anuales y diarios de hormonas de la reproducción en lubina., pp. 85-89 in *Avances en Endocrinología Comparada vol. IV*, edited by J. A. Muñoz-Cueto, J. M. Mancera and G. Martínez. Publicaciones Univ. Cádiz, España.
- BAYARRI, M. J., S. ZANUY, O. YILMAZ and M. CARRILLO, 2009 The effects of continuous light on the reproductive system of European sea bass as gauged by alterations of circadian variations during their first reproductive cycle. *Chronobiol. Int.* 26(2): 1-16.
- BEACHAM, T. D., and C. B. MURRAY, 1993 Accelation of maturity of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) using photoperiod control. *Aquaculture* 109: 315-325.
- BEGTASHI, I., L. RODRÍGUEZ, G. MOLÉS, S. ZANUY, and M. CARRILLO, 2004 Long-term exposure to continuous Light inhibits precocity in juvenile male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). I. Morphological aspects. *Aquaculture* 241: 539-559.
- BJÖRNSSON, B. T., O. HALLDORSSON, C. HAUX, B. NORBERG, and C. BROWN, 1998 Photoperiod control of sexual maturation of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): plasma thyroid hormone and calcium levels. *Aquaculture* 166: 117-140.
- BLYTE, W. G., L. A. HELFRICH, and C. V. SULLIVAN, 1994 Sex steroid hormone and vitellogenin levels in striped bass (*Morone saxatilis*) maturing under 6-, 9-, and 12-month photothermal cycles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94: 51-62.
- BON, E., B. BRETON, M. S. GOVOROUN, and F. LE MENN, 1999 Effects of accelerated photoperiod regimes on the reproductive cycle of the female rainbow trout: II-Season-



- nal variations of plasma gonadotropins (GTH I and GTH II) levels correlated with ovarian follicle growth and egg size. *Fish Physiol. Biol.* 20: 143-154.
- BOEUF, G. and P-Y. LE BAIL, 1999 Does light have influence of fish growth?. *Aquaculture* 177: 129-152.
- BROMAGE, N., 1987 The advancement of puberty or the time of first-spawning in female rainbow trout (*Salmo gairdneri*) maintained on altered-seasonal light cycles. pp. 303 in *Proc. Third Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish*, edited by D. R. Idler, L. M. Crim, J. M. Walsh. Memorial Univ. Newfoundland publications, Canada.
- BROMAGE, N., C. WHITEHEAD, and B. BRETON, 1982 Relationships between serum levels of gonadotropin, oestradiol 17-b and vitelogenin in the control of ovarian development in the rainbow trout. II. Effects of alterations in environmental photoperiod. *Gen. Comp. Endocrinol.* 47: 366-376.
- BROMAGE, N., R., J. A. ELLIOTT, J. R. C. SPRINGATE, and C. WHITEHEAD, 1984 The effects of constant photoperiods on the timing of spawning in the rainbow trout. *Aquaculture* 43: 213-223.
- BROMAGE, N. and J. DUSTON, 1986 The control of spawning in the rainbow trout using photoperiodic techniques. *Rep. Inst. Fres. Res. Drott.* 63: 26-35.
- BROMAGE, N. and R. CUMARANATUNGA, 1988 Egg production in the rainbow trout. *Rec. Adv. Aquacult.* 3: 63-138.
- BROMAGE, N., J. JONES, C. RANDALL, M. THRUST, B. DAVIES, J. SPRINGATE, J. DUSTON, and G. BAKER, 1992 Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg reproduction in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 100: 141-166.
- BROMAGE, N., C. RANDALL, J. DUSTON, and M. THRUST, 1993 Environmental control of reproduction in salmonids, pp. 55-66 in *Recent advances in aquaculture*, edited by J. F. Muir and R. J. Roberts. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K.
- BROMAGE, N., M. PORTER, and C. RANDALL, 2001 The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197: 63-98.
- BROWN, J. A., M. HELM, and J. MOIR, 1995 New candidate species for aquaculture, pp. 341-362 in *Cold water aquaculture in Canada*, 2nd edn, edited by A. D. Bohen, Tribune Press, Sackville.
- CAMPBELL, B., J. T. DICKEY and P. SWANSON, 2003 Endocrine changes during onset of puberty in male spring Chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*. *Biol. Reprod.* 69: 2109-2117.
- CARRILLO, M., N. BROMAGE, S. ZANUY, F. PRAT, and R. SERRANO, 1989 The effects of modifications in photoperiod on constant spawning time, ovarian development, and egg quality in the sea bass. *Aquaculture* 81: 351-365.



- CARRILLO, M., N. BROMAGE, S. ZANUY, R. SERRANO, and J. RAMOS, 1991 Egg quality and fecundity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and the effects of photo-periodically induces advances and delays of spawning time, pp. 154-157 in Proc. IVth Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish, edited by A. P. Scott, J. Sumpter, D. Kime and M. Rolfe. Norwich, U.K.
- CARRILLO, M., S. ZANUY, F. PRAT, R. SERRANO, and N. R. BROMAGE, 1993 Environmental induction of spawning in sea bass, pp. 43-54 in Recent advances in Aquaculture, vol 4, edited by R. J. Roberts and J. Muir. Blackwell Scientific publications, London.
- CARRILLO, M., S. ZANUY, F. PRAT, J. CERDÁ, J. RAMOS, E. MAÑANÓS, and N. BROMAGE, 1995. Sea bass, pp. 138-168 in Broodstock management and egg and larval quality, edited by N. R. Bromage and R. J. Roberts. Blackwell, Oxford, U.K.
- CARRILLO, M., S. ZANUY, F. PRAT, J. CERDÁ, J. RAMOS, E. MAÑANÓS, and N. Bromage, 1995b. Nutricional and photoperiodic effects on hormonal cycles and quality of spawning in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Neth. J. Zool.* 45: 204-209.
- CARRILLO, M., F.O. OYEN, J. CERDÁ, J. M. NAVAS, and J. RAMOS, 2000 Some criteria of the quality of the progeny as indicators of physiological broodstocks fitness. *Cah. Options Méditerr.* 47: 61-74.
- CARRILLO, M., M. J. BAYARRI, O. YILMAZ, and S. ZANUY, 2006 Daily variations of plasma melatonin and sexual steroids throughout the first reproductive cycle of sea bass. Abstracts 23th Conf. ECE Manchester 29 Aug- 2 Sep pp 91. Manchester, U.K.
- CARRILLO, M., S. ZANUY, G. MOLÉS, A. FELIP, B. MURIACH, E. MAÑANÓS, J. M. CERDÁ-REVERTER, I. BEGTASHI, and L. RODRÍGUEZ, 2007a Avances en la regulación hormonal de la diferenciación sexual y de la pubertad de la lubina europea, pp. 47-54 in *Avanços em Endocrinologia Comparativa Vol.III*, edited by A. V. M. Canário and D. M. Power. CCMAR- Univ. Algarve, Faro, Portugal.
- CARRILLO, M., A. FELIP, S. ZANUY, B. MURIACH, and J. M. CERDÁ REVERTER, 2007b Effects of sexual steroids on photoperiodic arrested early puberty (precocity) in juvenile male sea bass, pp. 276 in Proc. 8th Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish, edited by G. Roudaut, C. Labbé and J. Bobe, INRA-Université de Rennes, Saint-Malo, France.
- CARRILLO, M., V. CERQUEIRA, A. FELIP, and S. ZANUY, 2008a Sensibilidad a la luz y maduración en machos de lubinas pre-púberes , pp. 211-214 in *Avances en Endocrinología Comparada vol. IV*, edited by J. A. Muñoz-Cueto, J. M. Mancera and G. Martínez. Publicaciones Univ. Cádiz, España.
- CARRILLO, M., S. ZANUY, A. FELIP, M.J. BAYARRI, G. MOLES, and A. GÓMEZ, 2009. Hormonal and environmental control of puberty in perciform fish. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* Doi: 10.1196/annals. 1388.047.
- CAVACO, J. E. B., C. VILROKX, V. L. TRUDEAU, R. W. SCHULZ, and H. J. T. GOOS, 1998 Sex steroids and the initiation of puberty in male African catfish, *Clarias gariepinus*. *Amer. J. Physiol.* 44: R1793-R1802.



- CAVACO, J. E. B., J. VAN BAAL, W. VAN DIJK, G. A. M. HASSING, H. J. TH GOOS, and R. W. SCHULZ, 2001a Steroid hormones stimulate gonadotrops in juvenile male African catfish (*Clarias gariepinus*). Biol. Reprod. 64: 1358-1365.
- CAVACO, J. E. B., J. BOGERD, H. GOOS, and R. W. SCHULZ, 2001b Testosterone inhibits 11-ketosterone- induced spermatogenesis in African catfish (*Clarias gariepinus*). Biol. Reprod. 65: 1807-1811.
- DAHLE, R., G. L. TARANGER, and B. NORBERG, 2000 Sexual maturation and growth of Atlantic cod *Gadus morhua* reared at different light intensities, pp. 336 in Proc. 6th Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish, edited by B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S. O. Stefansson. Bergen. University of Bergen, Institute of Marine Research, Bergen, Norway.
- DAVIE, A., M. J. R. PORTER, and N. R. BROMAGE, 2003 Photoperiod manipulation of maturation and growth of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Fish Physiol. Biochem. 28: 399-400.
- DAVIE, A., M. J. R. PORTER, N. R. BROMAGE, and H. MINGAUD, 2007 The role of seasonally altering photoperiod in regulating physiology in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Part I. Seasonal maturation. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 64: 84-97.
- DE ROUX, N., E. GENIN, J.C. CAREL, F. MASUDA, J. L. CHAUSSAIN, and E. MILGROM, 2003 Hypogonadotropic hypogonadism due to a loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 10972-10976.
- DEVAUCHELLE, N. and D. COVES, 1988 Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) reproduction in captivity: gametogenesis and spawning. Aquat. Living Resour. 1: 215-222.
- DUFOUR, S., Y. S. HUANG, K. ROUSSEAU, M. SBAIHI, N. LE BELLE, B. VIDAL, J. MARCHELIDON, B. QUERAT, E. BURZAWA-GERARD, C. F. CHANG and M. SCHMITZ, 2000 Puberty in teleosts: new insight into the role of the peripheral signals in the stimulation of pituitary gonadotropins, pp. 455-461 in Proc. 6th Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish, edited by B. Norberg, O. S. Kjesbu, G. L. Taranger, E. Andersson and S.O. Stefansson. Univ. Bergen/Institute of Marine Research, Bergen, Norway.
- DUNGAN, H. M., D. K. CLIFTON, and R. A. STEINER, 2006 Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. Endocrinology 147: 1154-1158.
- DUSTON, J., and N. BROMAGE, 1987 Constant photoperiod regimes and the entrainment of the annual cycle of reproduction in the female rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Gen. Comp. Endocrinol. 65: 373-384.
- DUSTON, J., and N. BROMAGE, 1991 Circannual rhythms of gonadal maturation in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Biol. Rhythms 6: 49-53.
- EDMUNDS, L. N., 1988 Cellular and Molecular Basis of Biological Clocks: Models and Mechanisms for Biological Timekeeping. Springer Verlag, Berlin, Germany.



- ENDAL, H. P., G. L. TARANGER, S. O. STEFANSSON, and T. HANSEN, 2000 Effects of continuous additional light on growth and sexual maturity in Atlantic salmon, *Salmo salar*, reared in sea cages. *Aquaculture* 191: 337-349.
- FALCON, J., 1999 Cellular circadian clocks in the pineal. *Prog. Neurobiol.* 58: 121-162.
- FALCÓN, J., L. BESSEAU, S. SAUZET, and G. BEUF, 2007 Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends Endocrin. Met.* 18 (2): 81-88.
- FELIP, A., S. ZANUY, and M. CARRILLO, 2006 Comparative análisis of growth performance and sperm motility between precocious and non-precocious males in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L). *Aquaculture* 256: 570-578.
- FELIP, A., S. ZANUY, M. CARRILLO, and A. GÓMEZ, 2008a Evidence for two distinct KISS genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptines with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Mol. Cell. Endocrinol.* Doi:10.1016/j.mce.11.017.
- FELIP, A., S. ZANUY, M. CARRILLO, and A. GÓMEZ, 2008b Molecular characterization of two sea bass g-protein-coupled receptor 54 (GPR54): cDNA cloning and expression analysis. 1st World Conference on Kisspeptide signalling in the brain. Córdoba, Spain.
- FELIP, A., S. ZANUY, B. MURIACH, J. M. CERDÁ-REVERTER, and M. CARRILLO, 2008c Reduction of sexual maturation in male *Dicentrarchus labrax* by continuous light both before and during gametogenesis. *Aquaculture* 275(1-4): 347-355.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, R., A. C. MARTINI, V. M. NAVARRO, J. M. CASTELLANO, C. DIEGUEZ, E. AGUILAR, L. Pinilla and M. Tena-Sempere, 2006 Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 254-255: 127-132.
- FILBY, A. L., R. VAN AERLE, J. DUITMAN, and C. R. TYLER, 2007 The kisspeptin/Gonadotropin-Releasing Hormone pathway and molecular signalling of puberty in fish. *Biol. Reprod.* 72: 278-289.
- FRANZTZEN, M., A. M. ARNESEN, B. DAMSGARD, H. TVEITEN, and H. K. JOHNSEN, 2004 Effects of photoperiod on sex steroids and gonadal maturation in Arctic charr. *Aquaculture* 240: 561-574.
- GARCÍA-LÓPEZ, A., E. PASCUAL, C. SARASQUETE, and G. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2006 Disruption of gonadal maturation in cultured Senegalensis sole *Solea senegalensis* Kaup by continuous light and/or constant temperature regimes. *Aquaculture* 261 (2): 789-798.
- GARCÍA-ALLEGUE, R., J. A. MADRID, and F. J. SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, 2001 Melatonin rhythms in European sea bass plasma and eye influence of seasonal photoperiod and water temperature. *J. Pineal Res.* 31: 68-75.



- GERN, W. A., and S. S. GREENHOUSE, 1988 Examination of *in vitro* melatonin secretion from superfused trout (*Salmo gairdneri*) pineal organ maintained under diel illumination or continuous darkness. Gen. Comp. Endocrinol. 71: 163-174.
- GILLET, C., 1991 Egg production in an Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) brood stock: effects of temperature on the timing of spawning and the quality of eggs. Aquat. Living Resour. 4: 109-116.
- GIRIN, M. and N. DEVAUCHELLE, 1978 Decalage de la periode de reproduction par raccourcissement des cycles photoperiodique et thermique chez poissons marines. Ann.Biol. Anim. Biochim. Biophys. 18: 1059-1066.
- GLASSER, F., T. MIKOLAJCZYK, B. JALABERT, J. F. BAROILLER, and B. BRETON, 2004 Temperature effects along the reproductive axis during spawning induction of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Gen. Comp. Endocrinol., 136: 171-179.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, D., N. ZMORA, E. MAÑANÓS, D. SALIGUT, S. ZANUY, Y. ZOHAR, A. ELIZUR, O. KAH and J. MUÑOZ-CUETO, 2002 Immunohistochemical localization of three prepro-GnRHs in the brain and pituitary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using antibodies to the corresponding GnRH-associated peptides. J. Comp.Neurol. 446: 95-113.
- GOOS, H. J.Th., 1993 Pubertad development: big questions, small answers, pp. 11-20 in Cellular Communication in Reproduction, edited by F. Franchinetti, I.W. Henderson, R. Pierantoni and A. M. Polzonetti-Magni. Journal of Endocrinology Ltd, Bristol, UK.
- GRUMBACH, M. M., 2002 The neuroendocrinology of human puberty revisited. Horm. Res. 57: 2-14.
- GUILLESPIE, J. M-A., B. P. K. CHAN, D. ROY, F. CAI, and D. BELSHAM, 2003 Expression of circadian rhythm genes in GnRH-secreting GT1-7 neurons. Endocrinology 144: 5329-5338.
- HAY, D. E., 1986 Effects of delayed spawning on viability of eggs and larvae of Pacific herring. Trans. Am. Fish. Soc., 115: 155-161.
- HASTINGS, M. H., J. HERBER, N. D. MARTENSZ and A. C. ROBERTS, 1985 Annual reproductive rhythms in mammals: mechanisms of light synchronization. Ann. N Y Acad. Sci. 453: 182-204.
- HANSEN, T., S. O. STEFANSSON, and G. L. TARANGER, 1992 Growth and sexual maturation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. reared in sea cages at two different light regimes. Aquacult. Fish Manage. 23: 275-280
- HANSEN, T., O. KARLSEN, G. L. TARANGER, G-I HEMRE, J. C. HOLM, and O. S. KJESBU, 2001 Growth, gonadal development and spawning time of Atlantic cod (*Gadus morhua*) reared under different photoperiods. Aquaculture 203: 51-67.



- HOOVER, E. E., 1937 Experimental modification of the sexual cycle in trout by control of light. *Science* 86: 425-426.
- HOWELL, R., D. L. BERLINSKY and T. M. BRADLEY, 2003 The effects of photoperiod manipulation on the reproduction of black sea bass (*Centropomus striata*). *Aquaculture* 218: 651-669.
- HUANG, Y. S., K. ROUSSEAU, N. LE BELLE, B. VIDAL, E. BURZAWA-GERARD, J. MARCHELIDON, and S. DUFOUR, 1998 Insuline-like growth factor-I stimulates gonadotropin production from eel pituitary cells: a possible metabolic signal for induction of puberty. *J. Endocrinol.* 159: 43-52.
- IIGO, M., H. KEZUKA, K. AIDA, and I. HANYU, 1991 Circadian rhythms of melatonin secretion from superfused goldfish (*Carassius auratus*) pineal glands *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83: 152-158.
- IIGO, M., K. MIZUSAWA, M. YOKOSUKA, M. HARA, R. OHTANI-KANEKO, M. TABATA, K. AIDA, and K. HIRATA, 2003 In vitro photic entrainment of the circadian rhythm in melatonin release from the pineal organ of a teleost, ayu (*Plecoglossus altivelis*) in flow-through culture. *Brain Res.* 982 (1): 131-135.
- IMSLAND, A. K., M. DRAGSNES and S. O. STEFANSSON, 2003 Exposures to continuous light inhibits maturation in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 219: 911-919.
- JOHNSON, R. M., T. M. JOHNSON, and R. L. LONDRVILLE, 2000 Evidence for leptin expression in fishes. *J. Exp. Zool.* 286: 718-724.
- KANDA, S., Y. AKAZOME, T. MATSUNAGA, N. YAMAMOTO, S. YAMADA, H. TSUKAMURA, K-I MAEDA and Y. OKA, 2008 Identification of Kiss-1 product kisspeptin and Steroid-sensitive sexually-Dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinology*. 149(5): 2467-2476.
- KUROKAWA, K., S. UJI, and T. SUSUKI, 2005 Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from puffer fish, *Takifugu rubripes*. *Peptides* 26: 745-750-
- LEGAC, F., M. LOIR, P.Y. LEBAIL and M. OLLITRAULT, 1996 Insulin-like growth factor (IGF-I) mRNA and IGF-I receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and Sertoli cells. *Mol. Reprod. Dev.* 44: 23-35.
- LYTHGOE, J. N., 1980 Vision in fishes: Ecological Adaptations, pp. 431-445 in *Environmental Physiology of Fishes*, edited by Ali, M. A. Plenum Press, New York.
- MAÑANÓS, E., S. ZANUY, and M. CARRILLO, 1997 Photoperiodic manipulations of the reproductive cycle of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and their effects on gonadal development, and plasma 17 β -estradiol and vitelogenin levels. *Fish Physiol. Biochem.* 16: 211-222.



- MARTÍNEZ-CHÁVEZ, C. C., M. MATTEO, and H. HERVE, 2008 GPR54 and rGnRH I gene expression during the onset of puberty in Nile tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* (en prensa).
- MATSUYAMA, M., S. ADACHI, Y. NAGAHAMA, K. MARUYAMA y S. MATSURA, 1990 Diurnal rhythm of serum steroid hormone levels in the Japanese whiting, *Silago japonica*, a daily-spawning teleost. *Fish Physiol. Biochem.* 8: 329-338.
- MECHALLY A., J. VIÑAS, and F. PIFERRER, 2007 Molecular cloning and sequence characterization of a G protein-coupled receptor (GPR54) in the Senegal sole (*solea senegalensis*), pp 109 in 8th Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish, edited by G. Roudaut, C. Labbé and J. Bobe. INRA-University de Rennes, sain-Malo, France.
- MIGAUD, H., N. WANG, J.-N. GARDEUR, and P. FONTAINE, 2006 Influence of photoperiod on reproductive performances in eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquaculture* 252: 385-393.
- MIURA T., C. MIURA, T. OHTA, M.R. NADER, T. TODO, and K. YAMAUCHI, 1999 Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 264: 230-234.
- MIURA, T., K. YAMAUCHI, H. TAKAHASHI, and Y. NAGAHAMA, 1991 Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5774-5778.
- MIURA, C., T. HIGASHINO, and T. MIURA, 2007 A progestin and an estrogen regulate early stages of oogenesis in fish. *Biol. Reprod.* 77: 822-828.
- MOHAMED, J. S., A. D. BENNINHOFF, G. J. HOLT and I. A. KHAN, 2007 Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia. *J. Mol. Endocrinol.* 38: 235-244.
- MOLÉS, G., M. CARRILLO, E. MAÑANÓS, C. C. MYLONAS and S. ZANUY, 2007 Temporal profile of brain and pituitary GnRHs, GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 150: 75-86.
- MOLÉS, G., A. GÓMEZ, A. ROCAH, M. CARRILLO, and S. ZANUY, 2008 Purification and characterization of follicle-stimulating hormone from pituitary glands of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 158(1): 68-76.
- MURASHITA, K., S. UJI, T. YAMAMOTO, I. RØNNESTAD, and T. KUROKAWA, 2008 Production of recombinant leptin and its effects on food intake in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 150(4): 355-361.
- NADER M. R., T. MIURA, N. ANDO, C. MIURA, and K. YAMAUCHI, 1999 Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates all stages of 11-ketotestosterone-induced spermatogenesis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, in vitro. *Biol. Reprod.* 61: 944-947.



- NAGASAKA, R., N. OKAMOTO, and H. USHIO, 2006 Increased leptin may be involved in the short life span of ayu (*Plecoglossus altivelis*). J. Exp. Zool. 305A: 507-512.
- NICOL, J. A. C., 1989 The photoenvironment. In: The Eyes of Fishes. Clarendon Press, Oxford.
- NOCILLADO, J., and A. ELIZUR, 2007 Neuroendocrine regulation of puberty in fish. Mol. Rep. Dev. 75(2): 355-361.
- NORBERG, B., C. L. BROWN, O. HALLDORSSON, K. STENSLAND and B. J. BJÖRNSSON, 2004 Photoperiod regulates the timing of sexual maturation, spawning, sex steroid and thyroid hormone profiles in Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquaculture 229: 451-467.
- OJEDA, S. R. and M. K. SKINNER, 2005 Puberty in the rat, pp. 2061-2126 in The physiology of reproduction, edited by J.D. Neill, San Diego, Academic Press.
- OKUZAWA, K., 2002 Puberty in teleost. Fish Physiol. Biochem. 26: 31-41.
- OKUZAWA, K., N. KUMAKURA, A. MORI, K. GEN, S. YAMAGUCHI and H., KAGAWA, 2002 Regulation of GnRH and its receptor in a teleost, red sea bream, pp. 95-110 in Progress in Fish Research vol. 141, edited by I.S. Parhar, Elsevier Science B.V.
- OPPEDAL, F., G. L. TARANGER, J. E. JUELL, J. E., FOSSEIDENGEN and T. HANSEN, 1997 Light intensity affects growth and sexual maturation of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolts in sea cages. Aquat. Living Resour. 10: 351-357.
- OHTA, T., H. MIYAKE, C. MIURA, H. KAMEI, K. AIDA, and T. MIURA, 2007 Follicle-stimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. Biol. Reprod. 77: 970-977.
- PANKHURST, N. W., G. J. PURSER, G. VAN DER KRAAK, P. M. THOMAS, and G. N. R. Forreath, 1996 Effects of holding temperature on ovulation, egg fertility, plasma levels of reproductive hormones and in vitro ovarian steroideogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 146: 277-290.
- PARENT, A.-S., G. TEILMANN, A. JUUL, N. E. SKAKKEBAEK, J. TOPPARI, and J. P. BOURGUIGNON, 2003 The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. Endoc. Rev. 24: 668-693.
- PARHAR, I. S., S. OGAWA, and Y. SAKUMA, 2004 Laser capture single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish. Endocrinology 145: 3613-3618.
- PATÍÑO, R., and C. V. SULLIVAN, 2002 Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fishes. Fish Physiol. Biochem. 26: 57-70.
- PAVLIDIS, M., S. KERAVEC, L. GREENWOOD, B. MOUROT, A. P. SCOTT, 2001 Reproductive performance of common dentex, *Dentex dentex*, broodstock held under



- different photoperiod and constant temperature conditions. *Fish Physiol. Biochem.* 25: 171-180.
- PEYON, P., S. ZANUY, and M. CARRILLO, 2001 Action of leptin on in vitro luteinizing hormone release in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol. Reprod.* 65: 1573-1578.
- PONCIN, P., 1989 Effects of different photoperiods on the reproduction of barbell, *Barbus barbus* (L.), reared at constant temperature. *J. Fish Biol.* 35: 395-400.
- PONCIN, P., 1991 Environmental and endocrine control of Barbel (*Barbus barbus*) reproduction, pp. 148-150 in *Proc. IV Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish*, edited by A.P., Scott, J. Sumpter, D. Kime, M. Rolfe. Sheffield, Fish Symp. 91. U.K.
- PORTER, M. J. R., N. J. DUNCAN, D. MITCHELL, and N. R. BROMAGE, 1999 The use of cage lighting to reduce plasma melatonin in atlantic salmon (*Salmo salar*) and its effects on the inhibition of grilising. *Aquaculture* 176: 237-244.
- PRAT, F., S. ZANUY, N. BROMAGE, and M. CARRILLO, 1999 Effects of constant short and long photoperiod regimes on the spawning performance and sex steroid levels of female and male sea bass. *J. Fish Biol.* 54: 125-137.
- RANDALL, C. F. U.K., N. R. BROMAGE, M. J. R. PORTER, J. GARDENER, and N. A. AU-CHINACHIE, 1999 Circannual rhythms of reproduction in rainbow trout, pp. 325-327 in *Proc. VIth Int. Symp. Reprod. Physiol. fish*, Bergen 4-9 July, edited by G. L. Taranger, B. Norberg, S. Stefansson, T. Hansen, O. Kjesbu, E. Andersson. Bergen, Norway.
- RANDALL, C. F., N. R. BROMAGE, J. E. THORPE, M. S. MILES, and J. S. MUIR, 1995 Melatonin rhythms in Atlantic salmon (*Salmo salar*) maintained under natural and out-of-phase photoperiods. *Gen. Comp. Endocrinol.* 98: 73-86.
- REITER, R. J., 1993 The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49: 654-664.
- ROA, J., E. AGUILAR, C. DIEGUEZ, L. PINILLA, and M. TENA-SEMPERE, 2007 New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front. Neuroendocrinol.* 156: 48-69.
- RODRÍGUEZ, L., I. BEGTASHI, S. ZANUY, and M. CARRILLO, 2000 Development and validation of an enzyme immunoassay for testosterone: effects of photoperiod on plasma testosterone levels and gonadal development in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). at puberty. *Fish Physiol. Biochem.* 23: 141-150.
- RODRÍGUEZ, L., I. BEGTASHI, S. ZANUY, M. SHAW, and M. CARRILLO, 2001a Changes in plasma levels of reproductive hormones during first sexual maturation in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) under artificial day lengths. *Aquaculture* 202: 235-248.



- RODRÍGUEZ L., S. ZANUY, and M. CARRILLO, 2001b Influence of daylength on the age at first maturity and somatic growth in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Aquaculture* 196: 159-175.
- RODRÍGUEZ, L., M. CARRILLO, L. A. SORBERA, Y. ZOHAR, and S. ZANUY, 2004 Effects of photoperiod on pituitary levels of three forms of GnRH and reproductive hormones in the male European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) during testicular differentiation and first testicular recrudescence. *Gen. Comp. Endocrinol.* 136: 37-48.
- RODRÍGUEZ, L., I. BEGTASHI, S. ZANUY, and M. CARRILLO, 2005 Long-term exposure to continuous light inhibits precocity in European male sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L): hormonal aspects. *Gen. Comp. Endocrinol.* 140: 116-125.
- SCHALLY, A. V., A. ARIMURA, and A. J. KASTIN, 1973 Hypothalamic regulatory hormones. *Science* 179: 341-350.
- SCHULZ, R. W., and H. J. TH. GOOS, 1999 Puberty in male fish: Concepts and recent developments with special reference to the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 177: 5-12.
- SCHULZ, R. W., and T. MIURA, 2002 Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol. Biochem.* 26: 43-56.
- SCHULTZ, T. F., and S. A. KAY, 2003 Circadian clocks in daily and seasonal control of development. *Science* 301: 326-328.
- SCHULTZ, R. W., E. ANDERSSON, and G.-L. TARANGER, 2006 Photoperiod manipulation can stimulate or inhibit pubertal testis maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Anim. Reprod.* 3: 121-126.
- SEMINARA, S. B., S. MESSENGER, E. E. CHATZIDAKI, R. R. THRESHER, J. S. ACIERNO, J. K. SHAGOURI, Y. BO-ABBAS, W. KUOHUNG, K. M. SCHIWINOF, A. G. HENDRICK, D. ZAHN, J. DIXON, U. B. KAISER, S. A. SLAUGENHAUPT, J. F. GUSELLA, S. O'RAHILLY, M. B. CARLTON, W. F. CROWLEY, S. A. APARICIO, and W. H. COLLEDGE, 2003 The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New Engl. J. Med.* 349: 1614-1627.
- SMITH, J. T., 2008 Kisspeptin signalling in the brain: Steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Res. Rev.* 57: 288-298.
- SMITH, ANN V. L. TRUDEAU, L. M. WILLIAMS, M-G MARTINOLI, and I. G. PRIEDE, 1996 Melatonin receptors are present in non-optic regions of the brain of a deep-sea fish living in the absence of solar light. *J. Neuroendocrinol.* 8: 655-658.
- SPICER, L. J., 2001 Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction Domestic Animal Endocrinol. 21: 251-270.
- STRÜSSMANN, C. A., and M. NAKAMURA, 2002 Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 26: 13-29.
- SUNDARARAJ, B., S. VASAL, and F. HALVER, 1982 Circannual rhythmic ovarian recrudescence in the catfish. *Adv. Biosci.* 41: 319-337



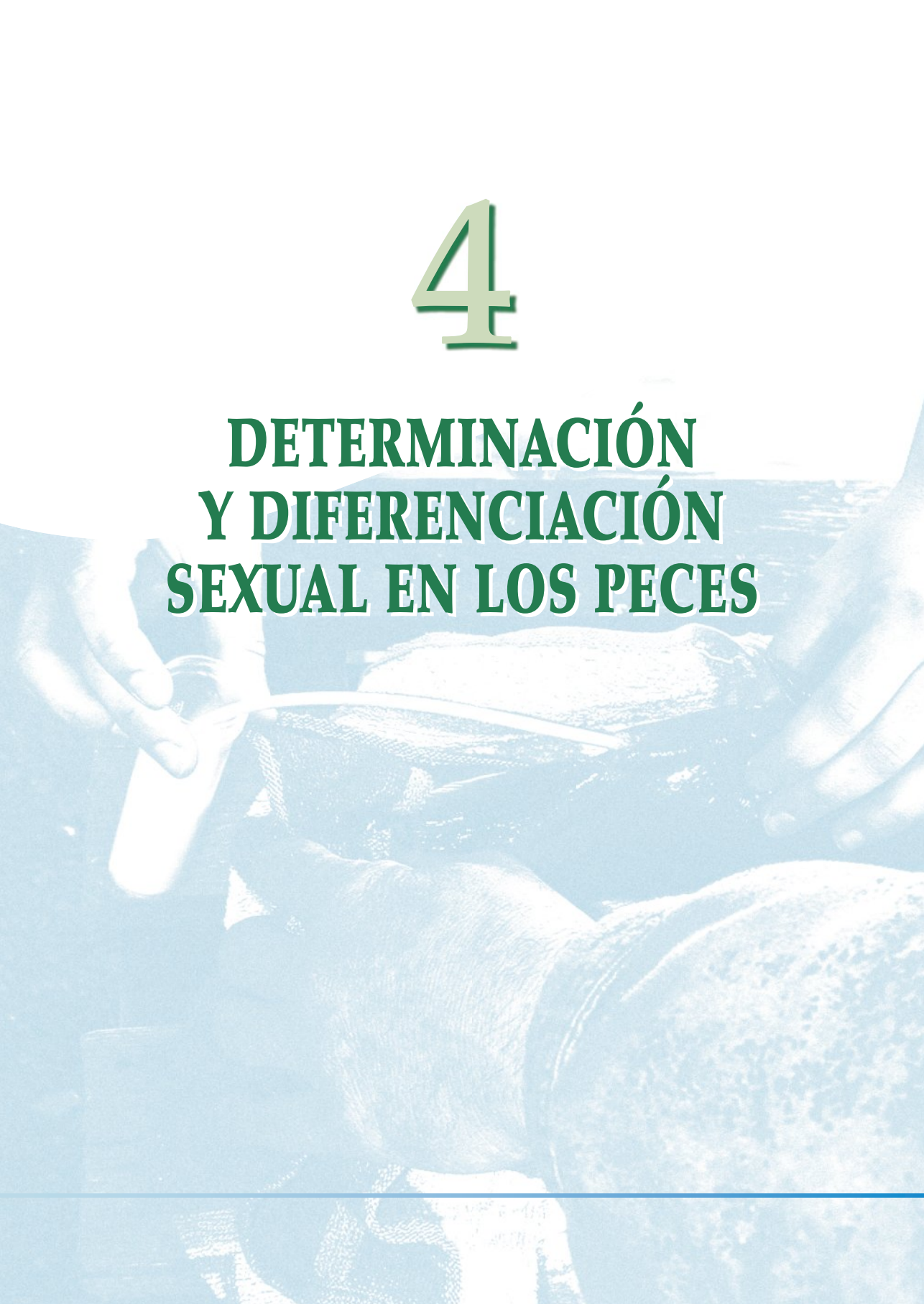
- TAKAHASHI, J. S., 1995 Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *A. Rev. Neurosci.* 18: 531-553.
- TAKASHIMA F., and Y. YAMADA, 1984 Control of maturation in masu salmon by manipulation of photoperiod. *Aquaculture* 43: 319-337.
- TARANGER, G. L., and T. HANSEN, 1993 Ovulation and egg survival following exposure of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., broodstock to different water temperatures. *Aquacult. Fish. Manage.*, 24: 151-156.
- TARANGER, G. L., C. HAUX, S. O. STEFANSSON, B. T. BJÖRNSSON, B. T. WALTER, and T. HANSEN, 1998 Abrupt changes in photoperiod affect age at maturity, timing of ovulation and plasma testosterone and oestradiol-17 β profiles in atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 162: 85-98.
- TARANGER, G. L., L. AARDAL, T. HANSEN, and O. S. KJESBU, 2006 Continuous light delays sexual maturation and increases growth of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) in sea cages. *ICES J. Mar. Sci.*, 63: 365-375.
- TAYLOR J. F., H. MIGAUD, M. J. R. PORTER, and N. R. BROMAGE, 2005 Photoperiod influences growth rate and plasma insulin-like growth factor-1 levels in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142: 169-185.
- TENA-SEMPERE, M., and M. L. BARREIRO, 2002 Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Mol. Cell. Endocrinol.* 188: 9-13.
- TENA-SEMPERE, M., 2006 GPR54 and kisseptin in reproduction. *Hum. Reprod. Update*, 12: 631-639.
- THOMSON, A. L., 1950 Factors determining the breeding season of birds: an introductory review. *Ibis* 92: 173-184
- VAN AERLE, R. P., A. KILLE, and C. R. TYLER, 2008 Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides* 29: 57-64.
- VUTHIPHANDCHAI, V., J. STUBBLEFIELD, and Y. ZOHR, 2002 Effects of phase-shifted photoperiod regimes on oocyte growth and hormonal profiles in female striped bass *Morone saxatilis*. *J. World Aquacult. Soc.* 33: 358-368.
- WEBB, M. A. H., J. P. VAN EENENMAAM, S. I. DOROSHOV, and G. P. MOBERG, 1999 Preliminary observations on the effects of holding temperature on reproductive performance of female white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson. *Aquaculture*, 176: 315-329.
- WEIL, C., M. TAOUIS, P.Y. LE BAIL, F. LE GAC, and N. SABIN, 1999a Is leptin involved in gonadotropin production in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) pp. 491 in *Proc. 6th Int. Symp. Reprod. Physiol. Fish*, edited by B. Norberg, O. S. Kejesbu, G. L. Taranger, E. Andersson, SW. O. Stefansson. Bergen, Norway.
- WEIL, C., F. CARRÉ, O. BLAISE, B. BRETON, and P.Y. LE BAIL, 1999b Differential effect of insulin-like growth factor I on *in vitro* gonadotropin (I and II) and growth hormone secretions in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of the reproductive cycle. *Endocrinology* 140: 2054-2062.



- WONG M. M. L., R. M. K. YU, P. K. S., NG, S. H. W. LAW, A. K. C. TSONG, and R. Y. C. Kong, 2007 Characterization of a hypoxia-responsive leptin receptor (omLep R(L)) cDNA from the marine nacara (*Oryzias melastigma*). Mar. Pollut. Bull. 54: 797-803.
- WU, F. C. W., 1995 GnRH pulse generator activity during human puberty, pp.185-187 in The Neurobiology of Puberty, edited by T.M. Plant, P. A. Lee. Journal of Endocrinology Ltd, Bristol, U.K.
- YACOVITZ, M., G. SOLOMON, E. E. GUSAKOVSKY, B. LEVAVI-SIVAN, and A. GERTLER, 2008 Purification and characterization of recombinant pufferfish (*Takifugu rubripes*) leptin. Gen. Comp. Endocrinol. 156: 83-90.
- YARON, Z., and B. SIVAN, 2006 Reproduction, pp. 333-386 in The physiology of fishes, edited by D.H. Evans and J.B Claibourne. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton
- ZACHMANN, A., S. C. M. KNIFF, M. A. ALI, and M. ANCTIL, 1992a Effects of photoperiod and different intensities of light exposure on melatonin levels in the blood, pineal organ, and retina of the brook trout (*Salvelinus fontinalis* Mitchell) Can. J. Zool. 70: 25-29.
- ZACHMANN, A., J. FALCÓN, S. C. M. KNIFF, V. BOLLIER, and M. A. ALI, 1992b Effects of photoperiod and temperature on rhythmic melatonin secretion from the pineal organ of the white sucker (*Catostomus commersonii*) *in vitro*. Gen. Comp. Endocrinol. 86: 26-33.
- ZHDANOVA, I.V., and S.G. REEBS, 2005. Circadian rhythms in fish. Fish Physiol. 24: 197-238.
- ZANUY, S., M. CARRILLO, and F. RUIZ, 1986 Delayed gametogenesis and spawning of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) kept under different photoperiod and temperature regimes. Fish Physiol. Biochem. 2: 53-63.
- ZANUY, S., F. PRAT, M. CARRILLO, and N. BROMAGE, 1995 Effects of constant photoperiod on spawning and plasma 17 β -oestradiol levels of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquat. Living Resour. 8: 147-152.
- ZANUY, S., M. CARRILLO, A. FELIP, L. RODRÍGUEZ, M. BLÁZQUEZ, J. RAMOS, and F. PIFERRER, 2001 Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Aquaculture 202: 187-203.
- ZOHAR, Y., G. PAGELSON, and M. TOSKY, 1988 Daily changes in reproductive hormone levels in the female gilthead seabream *Sparus aurata* at the spawning period. In Reproduction in fish basic and applied aspects in endocrinology and genetics, INRA Eds.: 119-125. Les Colloques de l'INRA, n.º 44. Paris, France.
- ZOHAR, Y., M. HAREL, S. HASSIN, and A. TANDLER. 1995 Gilt-Head sea bream (*Sparus aurata*), pp. 94-117 in broodstock management and egg and larval quality, edited by N. R. Bromage and R. J. Roberts. Blackwell Science, Oxford, U.K.

4

DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL EN LOS PECES





DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL EN LOS PECES

Francesc Piferrer

Instituto de Ciencias del Mar (CSIC)

Resumen

Los peces son el grupo más numeroso y diverso de vertebrados y presentan tres tipos de reproducción: gonocorismo, hermafroditismo y unisexualidad. La determinación sexual es el proceso mediante el cual se hereda el sexo y que establece el género masculino o femenino de un individuo. Normalmente es genotípica y puede implicar cromosomas sexuales con uno o varios factores principales, o varios factores menores distribuidos en los autosomas. Los genes relacionados con la determinación del sexo han evolucionado independientemente varias veces. En algunas especies, la determinación del sexo puede ser ambiental en respuesta a cambios de una variable como la temperatura. Por otro lado, la diferenciación sexual es el proceso mediante el cual una gónada indiferenciada se transforma en un ovario o testículo, dando lugar al sexo fenotípico. Los cambios morfológicos y genes implicados en la diferenciación sexual están evolutivamente bastante conservados. Sin embargo, este proceso es muy lábil en los peces, por lo que a veces según cuáles sean las condiciones ambientales el sexo fenotípico puede no coincidir con el genotípico. La determinación y diferenciación sexual son responsables de la proporción de sexos en las poblaciones, un parámetro demográfico que condiciona su estructura y capacidad reproductora. El estudio de la determinación y diferenciación sexual de los peces es de interés básico ya que permite entender cómo estos mecanismos han evolucionado. Asimismo, también tiene un claro interés para la acuicultura debido a la



existencia de dimorfismo sexual en algunos caracteres importantes para la producción, tales como el crecimiento y el tiempo hasta la maduración sexual. Recientemente, se ha sugerido un método basado en el control del genotipo y las proporciones de sexos para la gestión de poblaciones naturales y la erradicación de especies invasoras.

Abstract

Fish are the most numerous and diverse group of all vertebrates and exhibit three types of reproduction: gonochorism, hermaphroditism and unisexuality. Sex determination is the process by which sex is inherited and establishes the masculine or feminine gender of an individual. Sex determination is usually genotypic and can involve sex chromosomes, with one or several major sex factors or several minor factors distributed throughout the autosomes. The genes responsible have evolved independently several times. In some species, sex is instead determined according to changes of an environmental variable such as temperature. On the other hand, sex differentiation is the process by which an undifferentiated gonad is transformed into an ovary or testis, establishing the phenotypic sex. The morphological changes and the genes involved in sex differentiation are evolutionarily well conserved. However, this process is quite labile in fish and therefore at times, depending upon environmental conditions, phenotypic sex may not coincide with genotypic sex. Together, sex determination and differentiation are responsible for population sex ratios, a demographic parameter that influences their structure and reproductive capacity. The study of sex determination and differentiation allows the understanding of how these mechanisms have evolved. Likewise, it also has a clear applied interest for aquaculture due to the existence of a sexual dimorphism in some characters such as growth and time to maturity that are important for production. Recently, a method based on genotype and sex ratio control has been suggested for the management of natural populations and the eradication of invasive species.

4.1. INTRODUCCIÓN

De los cinco grandes grupos tradicionales de vertebrados (peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos), los peces constituyen el grupo más numeroso y diverso, representando más del 50% de todas las especies



de vertebrados. La cantidad de especies de peces conocidas aumenta progresivamente y actualmente el número de identificadas es cercano a las 28.000 (Nelson, 2006). Esta gran diversidad biológica es evidente no sólo en los aspectos morfológicos, tipos de hábitat, alimentación, comportamiento, etc. que muestran los peces, sino que se manifiesta también en lo que concierne a su reproducción.

4.1.1. La proporción de sexos o el sex ratio

La proporción de sexos es el número de machos y de hembras en una población, siendo un parámetro demográfico básico en ecología y el concepto sobre el cual giran buena parte de los aspectos que a continuación se tratan. Influye en la estructura de las poblaciones y determina su potencial reproductivo y, por tanto, de supervivencia de la especie (Hardy, 2002). La proporción de sexos es resultado de la existencia de los mecanismos de determinación y diferenciación sexual, de los que se ocupa este capítulo. Darwin (1871) reconoció que su estudio constituía un problema más complejo de lo que parece a primera vista y en «El Origen del Hombre y la Selección en Relación al Sexo» escribió:

«Hay ciertos animales (por ejemplo, peces y cirrípedos) en los cuales dos o más machos parecen ser necesarios para la fecundación de la hembra; y consecuentemente los machos predominan, pero de ninguna forma es obvio como esta tendencia a producir un exceso de machos pudo ser adquirida. Inicialmente pensé que cuando una tendencia a producir ambos sexos en la misma cantidad era provechosa para la especie, sería una consecuencia de la selección natural, pero ahora veo que el problema entero es tan complejo que es más seguro dejar la solución para el futuro».

Posteriormente, ya en el primer cuarto de s. xx, con la teoría de la evolución por selección natural afianzada, la herencia mendeliana firmemente establecida y la base cromosómica de la recombinación génica descubierta por T.H. Morgan, se dió un paso importante en la configuración de lo que se conoce como teoría sintética o neodarwinismo. Ello fue debido a la incorporación de la genética de poblaciones gracias en buena medida a las contribuciones de Fisher. En su obra «La Teoría Genética de la Selección Natural», Fisher (1930) demostró que



las propias presiones de la selección hacen que en la mayoría de los casos la proporción de sexos en las poblaciones naturales tienda a ser 1:1 (50% machos y 50% hembras). Más tarde se demostró que una proporción de sexos equilibrada constituye lo que se conoce como una estrategia evolutivamente estable (Maynard Smith, 1978).

Dos contribuciones posteriores terminaron de establecer el marco conceptual en donde se lleva a cabo hoy en día la investigación de los mecanismos de determinación y diferenciación sexual en vertebrados. La primera de ellas fue aportada por Charnov (1982) en su obra «La Teoría de Asignación de Sexos». Esta teoría trata de las causas últimas, el «por qué» de la evolución de las proporciones de sexos, y se concentra principalmente en dos aspectos: 1) la abundancia relativa de los diferentes tipos de reproducción o sexualidad, es decir, qué presiones evolutivas favorecen la aparición del gonocorismo vs. el hermafroditismo, y 2) cómo se determina en los hermafroditas la asignación de recursos a la producción de cada uno de los dos tipos de gametos (huevos vs. espermatozoides) y la dirección o polaridad del cambio de sexo. De acuerdo con la mencionada teoría, la selección natural actúa sobre la proporción de sexos. La presión selectiva sobre la proporción de sexos es la fuerza que modela la evolución de los mecanismos de determinación sexual responsables de la existencia de dicha proporción.

La otra contribución la aportó Bull (1983) en su libro «Evolución de los mecanismos de determinación sexual», en donde explicó los distintos sistemas que los animales usan para establecer la proporción de sexos y mostró cómo por evolución se puede pasar de uno a otro. Estos mecanismos constituyen las causas próximas, el «cómo», que producen la proporción de sexos. Así, pues, la proporción de sexos es el punto de unión entre la teoría de asignación de sexos y la evolución de los mecanismos de determinación sexual que la producen.

La proporción de sexos depende entonces de la combinación de determinación y diferenciación sexual. En su tratado «Biología del Desarrollo», Gilbert (1991) afirmó que dentro de los mecanismos biológicos esenciales el determinismo del sexo y su variación con la evolución constituye uno de los problemas más fascinantes de la biología. Además, las gónadas embrionarias son el único órgano animal que partiendo de un rudimento común es capaz de desarrollarse en dos



órganos adultos distintos: ovarios y testículos, y cambios a nivel molecular en los procesos de determinación y diferenciación sexual afectan la estructura demográfica de las poblaciones (Hardy, 2002).

4.1.2. Estudios previos y enfoque

El conocimiento de la determinación y diferenciación del sexo en peces fue exhaustivamente revisado por Devlin y Nagahama (2002). El impulso que parece haber dado esta revisión, junto con el descubrimiento del primer y hasta ahora único gen determinante del sexo en peces en el mismo año (Matsuda *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2002), probablemente explica el gran número de trabajos publicados a partir de dicha fecha, con varios descubrimientos significativos.

Las últimas revisiones disponibles pero focalizadas en aspectos concretos del estudio de la determinación y diferenciación sexual de los peces incluyen, tanto las de carácter básico como aplicado: Baroiller *et al.* (1999) y Baroiller y D'Cotta (2001), sobre las influencias ambientales sobre la proporción de sexos; Beardmore *et al.* (2001) y Piferrer (2001), sobre la masculinización y feminización hormonal, respectivamente, y sus aplicaciones en acuicultura; Strüssmann y Nakamura (2002), sobre diferenciación gonadal; Scharf (2004a, 2004b), sobre la evolución de cromosomas sexuales; Nagahama (2005), sobre algunos genes implicados; y Volff *et al.* (2007), sobre evolución de genes determinantes del sexo.

El estudio de la determinación y diferenciación sexual de los peces se ha convertido en un área muy activa de investigación. Este trabajo es deliberadamente superficial en la exposición, por lo que está enfocado a, por un lado, definir algunos conceptos esenciales y términos que con demasiada frecuencia se usan mal. Por otro, a dar una visión de conjunto y a dirigir a los que necesiten una información más detallada hacia una serie de trabajos publicados en revistas internacionales, que incluyen tanto investigaciones originales como revisiones, las cuales permitirán conocer el estado actual de nuestro conocimiento sobre la determinación y diferenciación sexual de los peces. En este sentido, los estudios publicados fundamentalmente en revistas internacionales desde la revisión de Devlin y Nagahama (2002) hasta la fecha han sido resumidos y discutidos en revisiones recientes y más detalladas, tanto



en lo que concierne a la determinación (Penman y Piferrer, 2008) como a la diferenciación sexual (Piferrer y Guiguen, 2008), a las que se remite al lector que quiera profundizar más. Este capítulo está dirigido a alumnos de cursos de doctorado y máster en temas relacionados con la fisiología animal, genética, acuicultura, gestión de recursos, medio ambiente, etc., así como a investigadores en áreas afines que quieran actualizar sus conocimientos sobre este tema.

Asimismo, sin poder evitar una cierta repetición con algunas partes del contenido de las citadas revisiones, se discuten algunos temas que cara a investigaciones futuras se consideran interesantes bajo la opinión personal del autor. Al final se encontrará un glosario que ayudará a comprender el significado de algunas definiciones esenciales en este tema. Para algunos términos problemáticos se ha recurrido a la definición empleada por Atz (1964).

Para evitar confundir al lector con siglas que en la lengua castellana o bien no existen, y por lo tanto se tendrían que inventar, o, caso de existir, prácticamente no se usan, en todo el trabajo se emplean las abreviaciones comúnmente utilizadas en inglés. Los nombres comunes utilizados en la denominación de las especies corresponden a los nombres vernaculares utilizados en sus respectivas áreas de distribución y han sido obtenidos fundamentalmente a través de Fishbase (www.fishbase.org).

4.2. TIPOS DE REPRODUCCIÓN

Los peces presentan todos los *tipos de reproducción* conocidos en vertebrados: gonocorismo, hermafroditismo y unisexualidad (Price, 1984). Asimismo, exhiben una amplia gama de *modos de reproducción*, que conciernen fundamentalmente el comportamiento sexual durante la freza, la presencia o ausencia de caracteres sexuales secundarios, el tipo de apareamiento, la fabricación de nidos para las puestas y el cuidado parental de los huevos. Los modos de reproducción de los peces fueron exhaustivamente revisados por Breder y Rosen (1966) en una obra de casi mil páginas, aún no superada, y no serán tratados aquí, menos aún al no estar relacionados con la determinación y diferenciación del sexo. Los distintos tipos de reproducción presentes en los peces se muestran en la Tabla 1.



TABLA 1.

Tipos de reproducción en los peces y ejemplos de especies representativas.

Tipo de reproducción	Subtipo		Especies representativas
Gonocorismo ¹	Diferenciado		Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>) Salmón Atlántico (<i>Salmo salar</i>)
	Indiferenciado ²		Anguila europea (<i>Anguilla anguilla</i>) Pez cebra (<i>Danio rerio</i>)
Hermafroditismo	Secuencial	Proterándrico	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)
		Proterogíneo	Pajel (<i>Pagellus erythrinus</i>)
		Bidireccional	<i>Trimma okinawae</i> (góbido tropical)
	Simultáneo		Besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>)
Unisexualidad	Ginogénesis		Topote amazona (<i>Poecilia formosa</i>) Pez rojo (<i>Carassius auratus gibelio</i>)
	Hibridogénesis		Guatopote (<i>Poeciliopsis monacha-lucida</i>)

Notas:

¹ Llamado a veces sexos separados o bisexualidad.

² Llamado a veces falso hermafroditismo o (de forma incorrecta) hermafroditismo juvenil.

4.2.1. Gonocorismo

El gonocorismo es con creces el tipo más abundante de reproducción sexual en los peces, y el único presente en anfibios, aves y mamíferos. Se caracteriza por la existencia de dos sexos separados, de forma que cada individuo produce o bien esperma y es un macho, o bien huevos y es una hembra. Su predominancia en los vertebrados refleja las ventajas de la reproducción sexual en los grupos más derivados de animales. En los peces, más del 90% de las especies para las que se conoce su tipo de reproducción son gonocoristas, las cuales incluyen a la mayoría de especies de interés comercial tanto para pesquerías como para la acuicultura, y no es de extrañar que la gran mayoría de investigaciones se ha llevado a cabo con este tipo de especies.

4.2.2. Hermafroditismo

El hermafroditismo es un tipo de reproducción sexual en el que cada individuo funciona como macho y hembra a lo largo de su vida. El hermafroditismo es muy habitual en las plantas e invertebrados pero en los vertebrados está presente exclusivamente en los peces. Para que una especie pueda ser clasificada como hermafrodita, es necesario que



el tipo *habitual* de reproducción de la *mayoría* de sus individuos sea el hermafroditismo. Por tanto, especies en las que muy raramente, o sólo bajo ciertas condiciones excepcionales (por ejemplo, tras la exposición a contaminación química o térmica), se encuentran individuos con ambas gónadas, con gónadas conteniendo tanto tejido masculino como femenino, o bien con una gónada claramente de un sexo pero con algunas células germinales propias del sexo contrario, no pueden clasificarse como hermafroditas. Ni siquiera como falsas hermafroditas, que es otro concepto (ver sección 4.4.2.3). Los criterios para la asignación de una especie como hermafrodita pueden consultarse en más detalle en Sadovy y Shapiro (1987).

La incidencia del hermafroditismo en los peces sólo había sido motivo de especulación, sin datos que avalasen un punto de vista en particular. Investigaciones recientes muestran que el total de especies hermafroditas ronda las 400 (Piferrer, Maynou, Ospina-Álvarez, Messeguer y Lloris, datos no publicados), lo que significa menos de el 1.5% de las 27.977 especies de peces identificadas hasta la fecha (Nelson, 2006). Sin embargo, si se atiende al número de especies hermafroditas respecto al número de especies para las que se conoce su modo de determinación sexual, unas 7.000, entonces el porcentaje de especies hermafroditas se acerca al 6% del total.

Aunque el hermafroditismo presenta, en teoría, una serie de ventajas sobre el gonocorismo y, como se ha mencionado antes, es muy frecuente en las plantas y en los invertebrados –lo que podría hacer pensar en un carácter ancestral–, lo cierto es que en los peces representa un carácter derivado que ha evolucionado independientemente varias veces. Nuestro estudio muestra que está presente en más de 30 familias, exclusivamente marinas. En un estudio reciente, aplicando de forma rigurosa los criterios de Sadovy y Shapiro (1987), Sadovy y Liu (2008) confirman el hermafroditismo funcional en 27 familias de peces y también una incidencia del 6% respecto al total de familias de teleósteos.

Las especies hermafroditas se dividen en secuenciales y simultáneas. Éstas últimas, como su nombre indica, producen gametos masculinos y femeninos al mismo tiempo, o en un periodo muy breve de tiempo, y aunque la autofertilización es teóricamente posible, en la práctica la



fertilización se lleva a cabo con gametos producidos por individuos distintos para evitar los problemas derivados de la consanguinidad. Las especies hermafroditas simultáneas (llamadas también hermafroditas sincrónicas) son un caso único dentro de los eucariotas con reproducción sexual, en tanto que todos los individuos de la población generan progenie (en el resto sólo las hembras lo hacen).

Las especies hermafroditas secuenciales (llamadas a veces también consecutivas) maduran primero como un sexo, al menos una vez, y después como el sexo opuesto el resto de las veces. Según sea la polaridad del cambio, se dividen en proterándricas (llamadas también protándricas) si primero maduran como machos, o proterogíneas (protogíneas) si lo hacen al revés (Lacadena, 1998). Últimamente, se ha descubierto que algunos góbidos tropicales y hermafroditas secuenciales son capaces de cambiar muchas veces de un sexo al otro siguiendo simples estímulos ambientales, y se los ha bautizado como hermafroditas secuenciales bidireccionales (Sunobe y Nakazono, 1993; Manabe *et al.*, 2007). La proteroginia es el tipo de hermafroditismo más común, comprendiendo aproximadamente dos tercios del total de todas las especies hermafroditas, seguido por la proterándria y el hermafroditismo simultáneo, sin duda el más minoritario (Piferrer, Maynou, Ospina-Álvarez, Messeguer y Lloris, datos no publicados).

Las especies proterogíneas pueden ser monándricas si todos los machos se originan a partir de hembras funcionales que experimentan el fenómeno de cambio de sexo y a estos machos resultantes se les llama machos secundarios; o bien diándricas, en las que existen dos tipos de machos: machos primarios, que maduran como tales por primera vez, es decir, el animal pasa de indiferenciado a macho primario sin experimentar jamás el cambio de sexo, y machos secundarios, originados por el proceso de cambio de sexo. Igualmente, en los hermafroditas proterándricos hay dos tipos de especies, las monogíneas, sólo con la existencia de hembras secundarias, y las digíneas, con hembras primarias y secundarias (Sadovy y Liu, 2008).

El fenómeno del cambio de sexo se da por tanto sólo en los hermafroditas secuenciales y puede tener lugar en respuesta a la aparición de factores estimulantes o a la desaparición de factores inhibidores (Warner, 1988; Ross, 1990). En cualquier caso, el cerebro integra los



estímulos ambientales que dirigen el cambio de sexo en las gónadas (Francis, 1992). El mecanismo de señalización endocrino que transfiere a las gónadas la información integrada por el cerebro no ha sido aún descubierto, pero muy probablemente implica a las gonadotrofinas hipofisarias (FSH y LH) y a sus respectivos receptores en las gónadas.

En los últimos años se ha observado un progreso significativo en el conocimiento de los mecanismos hormonales intragonadales que gobiernan la reestructuración de la gónada durante el proceso de cambio de sexo (Frisch, 2001; Nakamura *et al.*, 2005), siendo, en resumen, una variante de los que operan en la regulación de las gónadas de especies gonocoristas con los mismos componentes. Una breve discusión sobre estos aspectos se encuentra en la sección 4.4.3.2.1

4.2.3. Unisexualidad

Las especies que tienen la unisexualidad como tipo de reproducción sólo contienen hembras que se reproducen por partenogénesis en algunas de sus variantes, ginogénesis e hibridogénesis, y han sido tratadas extensamente por Devlin y Nagahama (2002).

En la ginogénesis se produce descendencia a partir de huevos partenogenéticos que, sin embargo, precisan ser activados por el esperma de un macho de una especie próxima, aunque este esperma no contribuye genéticamente en la descendencia. Este es el caso del topote amazona, *Poecilia formosa*, una especie híbrida formada a partir del topote del Atlántico, *P. mexicana*, y del topote velo negro, *P. latipinna*. *P. formosa* produce huevos en los que se suprime la primera división meiótica, y por tanto la recombinación, dando lugar a una progenie clonal formada exclusivamente por hembras que son genéticamente idénticas a sus madres. Otros casos de reproducción unisexual incluyen los de algunas poblaciones de pez rojo, *Carassius auratus*, en las que coexisten formas gonocoristas y ginogenéticas de ploidía variable: *C. auratus gibelio*, gonocorista o bien triploide sólo hembras; *C. auratus lagsdorfi*, triploides sólo hembras, etc. Otras especies en las que coexisten líneas unisexuales incluyen híbridos entre *Phoxinus eos* y *P. neogaeus*, especies del género *Cobitis*, *Menidia*, *Fundulus* y *Rutilus* (Devlin y Nagahama, 2002). Los aspectos ecológicos y evolutivos de la ginogénesis han sido revisados por Schlupp (2005).



En la hibridogénesis las hembras se reproducen con un macho de una especie relacionada que sí contribuye con su esperma a la dotación genética de la descendencia. Cuando las hembras resultantes de dicho cruce producen sus propios huevos el conjunto de cromosomas homólogos de origen paterno se pierde, por lo que pasan a la descendencia sólo los cromosomas maternos. En este caso la reproducción no es completamente asexual sino hemi-clonal ya que el genoma materno se transmite intacto junto a nuevo material genético aportado por el padre. El caso mejor estudiado es de un pequeño pez del género *Poeciliopsis* que vive en arroyos de zonas desérticas del sur de EE.UU. y Méjico. Hembras de guatopote del Mayo, *P. monacha*, se reproducen con machos de una especie simpátrica, guatopote del mocrorito, *P. lucida*, y producen híbridos *P. monacha-lucida* que son todo hembras (Schulz, 1967) –lo que indica que en este caso la influencia materna en la determinación del sexo es más fuerte que la paterna– y que muestran características fenotípicas de ambas especies. Las hembras de *P. monacha-lucida* producen huevos que sólo contienen el genoma de *P. monacha*. Estos huevos se fertilizan por retrocruzamiento con esperma de *P. lucida*, con lo que la especie unisexual híbrida se perpetúa. Hay que señalar que estas especies son de fertilización interna y ovovivíparas.

La unisexualidad es el tipo menos frecuente de reproducción y se ha descrito bien sólo en unas pocas especies, representando menos del 1% para las que se conoce su tipo de reproducción. Sin embargo, su incidencia global no ha sido específicamente evaluada. Además, si se tiene en cuenta que las especies asexuales son crípticas por naturaleza e incluyen especies híbridas de ploidía variable, su número podría superar el centenar (Vrijenhoek *et al.*, 1989). Muchas de estas especies se originan por multiplicación de juegos enteros de cromosomas como consecuencia de hibridaciones intra- o interespecíficas (auto- y alopolioidía, respectivamente). Un ejemplo en la península ibérica es el ciprínido *Iberocypris* (antes *Squalius*) *alburnoides* (Alves *et al.*, 2001). La incidencia de especies auto- y alopolioides en poblaciones naturales de peces así como los mecanismos que hacen posible su aparición han sido revisadas recientemente por Piferrer *et al.* (2009).



4.3. DETERMINACIÓN SEXUAL

4.3.1. Definición y mecanismos

La determinación del sexo es el proceso genético o ambiental mediante el cual se establece el género (macho, hembra) de un individuo (Bull, 1983). Esta definición no parece muy buena, puesto que «determinar» y «establecer» pueden ser sinónimos, pero es la mejor que se ha encontrado, quizá un poco mejor que otras como aquella que postula que la determinación del sexo es «cualquier de los varios mecanismos por el cual el sexo de un animal (o planta) se determina» (Uller *et al.*, 2007). Lo importante es darse cuenta que la determinación del sexo es un proceso (conjunto de acciones que tienen un resultado observable) que, por cierto, puede involucrar a distintos mecanismos, y que estas acciones pueden venir controladas por la información genética que hereda el individuo o en respuesta a cambios en las condiciones ambientales.

Los peces y los reptiles, en los vertebrados, pueden tener dos tipos de determinación sexual: 1) En la determinación sexual genotípica (GSD) el sexo se establece en el momento de la concepción (o transcurrido muy poco tiempo después de ella) y existen diferencias genéticas entre los sexos. 2) Determinación ambiental del sexo (ESD), en donde entre sexos no existen diferencias genéticas consistentes y el sexo se determina transcurrido un tiempo (del orden de días o semanas) tras la fertilización (Bull, 1983; Valenzuela *et al.*, 2003; Sarre *et al.*, 2004). La relación entre determinación y diferenciación sexual, y también con el fenómeno del cambio de sexo en las especies que lo presentan, aparece relacionado en un contexto ontogenético en la Figura 1.

La herencia del sexo está basada en tres efectos principales: 1) factores sexuales principales, 2) factores sexuales menores y 3) diferencias ambientales. Los dos primeros casos corresponden a GSD, mientras que el último corresponde a ESD. Las unidades que se segregan y que son la base hereditaria de las diferencias en determinación del sexo se llaman factores sexuales. En un sistema simple como el de los mamíferos, los factores sexuales que se segregan son el cromosoma X e Y. En los sistemas múltiples hay varios factores sexuales (siendo su número

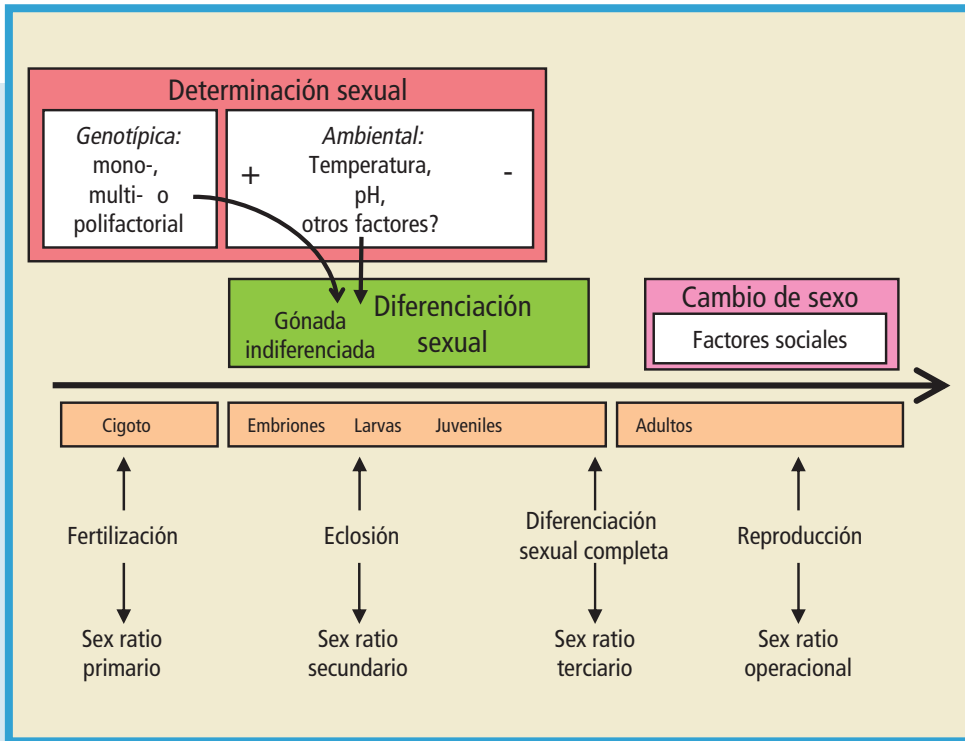


FIGURA 1.

Esquema de la determinación y diferenciación sexual y del cambio de sexo en relación al desarrollo de los peces. La flecha horizontal gruesa indica el tiempo y junto a ella se representan las distintas fases del desarrollo, comenzando por la formación del cigoto hasta que los animales llegan a adultos y se reproducen. La determinación sexual puede ser genotípica, en cuyo caso se establece en el momento de la formación del cigoto tras la fertilización, o ambiental, actuando más tarde durante la embriogénesis, desarrollo larvario o etapa juvenil, dependiendo de las especies. Sin embargo, los efectos ambientales acostumbran a ser más pronunciados (+) cuando más indiferenciada está la gónada, disminuyendo su efecto (-) con el tiempo. En cualquier caso, la determinación sexual actúa sobre gónadas ya formadas pero aún sexualmente indiferenciadas, dirigiendo el proceso de diferenciación sexual (flechas gruesas hacia abajo) hacia la formación de un ovario o testículo. Producto de la determinación y diferenciación sexual es la proporción de sexos resultante (sex ratio). En las especies hermafroditas del tipo secuencial se da, además, el fenómeno del cambio de sexo, que puede verse como una rediferenciación sexual de adultos que ya se han reproducido. Para cada evento asociado a una fase del desarrollo, por ejemplo, la formación del cigoto tras la fertilización, se indica también el tipo de sex ratio resultante (ver discusión de este concepto en el texto). Modificado de Piferrer (2007).



conocido y sus efectos medibles) y en los sistemas polifactoriales hay muchos factores involucrados, pero difíciles de cuantificar y de medir su efecto individual. Dentro de los factores sexuales, los principales tienen efectos importantes y claros, mientras que los menores tienen efectos pequeños sobre la determinación del sexo. Las transiciones evolutivas de un sistema a otro son posibles (Bull, 1983; Ezaz *et al.*, 2006). Para una especie, o incluso población dada dentro de una especie, la determinación del sexo se puede explicar por una combinación de los tres tipos de efectos citados.

4.3.2. Determinación sexual genotípica

La determinación sexual genotípica (GSD) se basa en la herencia y segregación durante la formación de gametos de factores sexuales mayores y menores y es el tipo de determinación sexual predominante en los peces, mientras que ESD es un sistema muy minoritario en comparación. La herencia del sexo basada en factores sexuales mayores se conoce también con el nombre de herencia cromosómica y comprende sistemas monofactoriales¹, con un par único o múltiples cromosomas sexuales, y sistemas multifactoriales (ver la Tabla 2). En los sistemas cromosómicos el sexo puede ser predecido en función del genotipo de cigoto, y las proporciones de sexos resultantes normalmente se ajustan a 1: 1. Dentro de GSD, el mecanismo más común es el de un sistema monofactorial con un par único de cromosomas sexuales del tipo XX/XY o WZ/ZZ. En este sistema y en el de cromosomas sexuales múltiples el sexo homogamético puede ser el masculino o el femenino. A su vez, los cromosomas sexuales en los peces pueden ser homomórficos o heteromórficos (ver a continuación). En los sistemas cromosómicos multifactoriales cada individuo tiene un único par de cromosomas sexuales pero hay tres o más factores principales determinantes del sexo, por lo que ambos sexos son heterogaméticos.

¹ Según lo que se considere por factor (el elemento que se segrega y que constituye la herencia del sexo) el sistema XX/XY se llama sistema bifactorial o de dos factores (el X y el Y) por algunos autores, mientras que otros lo llaman monofactorial, por la herencia del gen *Sry*.



TABLA 2.
Tipos de determinación sexual en los peces gonocoristas

Determinación del sexo genotípica ¹ o ambiental	Herencia del sexo basada en	Tipo de mecanismo de determinación del sexo	Número de cromosomas sexuales en un individuo	Sexo heterogamético	Genotipo de las hembras	Genotipo de los machos	Cromosomas sexuales heteromórficos	Especies representativas	Referencias
Determinación del sexo genotípica (GSD)	Factores sexuales principales (sistemas cromosómicos)	Sistema monofactorial ²	Par único	Macho	XX	XY	No	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	1
							Si	Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) ⁵	2
					XX	XO	Si	<i>Triacanthus brevirostris</i>	3
			Hembra		WZ	ZZ	No	Tilapia azul (<i>Oreochromis aureus</i>) ⁶	4
							Si	<i>Leporinus</i> sp.	5
					WZ	ZO	Si	<i>Lepidocephalichthys guntea</i>	6
		Cromosomas sexuales múltiples	Macho		X ₁ X ₂ X ₃ X ₄	X ₁ X ₂ Y	Si	<i>Eigenmannia</i> sp.	7
					XX	X ₁ X ₂ Y	Si	<i>Hoplias</i> sp.	
				Hembra	W ₁ W ₂ Z	ZZ	Si	<i>Apareiodon affinis</i>	
		Multifactorial	Par único	Ambos	XX, WX, WY	XY, YY	No ⁴	Platyfish (<i>Xiphophorus maculatus</i>)	8
	Factores sexuales menores	Polifactorial	Cromosomas sexuales ausentes	n/a	n/a	n/a	n/a	Espada (<i>Xiphophorus helleri</i>)	8
Determinación del sexo ambiental (ESD)	Diferencias ambientales	Determinación del sexo dependiente de la temperatura ³	Cromosomas sexuales ausentes	n/a	n/a	n/a	n/a	Pejerrey del Atlántico (<i>M. menidia</i>) ⁷	9
		Determinación del sexo dependiente del pH	Cromosomas sexuales ausentes	n/a	n/a	n/a	n/a	<i>Apistogramma</i> sp.	10

Notas:

¹ Llamada a veces determinación genética del sexo.

² Llamado a veces bifactorial o sistemas de dos factores.

³ Referido como TSD en la literatura en inglés.

⁴ Cromosomas sexuales diferenciados sólo en algunas poblaciones (Nanda *et al.*, 1992).

⁵ Sólo en algunas poblaciones (Thorgaard, 1977).

⁶ Un locus secundario y modificador opera al menos en algunas poblaciones.

⁷ Sólo en algunas poblaciones (Lagomarsino y Conover, 1993).

n/a, no aplicable.

Referencias: 1, Aida (1921); 2, Thorgaard (1977); 3, Choudhury *et al.* (1982); 4, Campos-Ramos *et al.* (2001); 5, Solari (1994); 6, Sharma y Tripathi (1988); 7, Almeida Toledo y Foresti (2001); 8, Kallman (1984); 9, Conover y Kynard (1981); 10, Römer y Beisenherz (1996).

4.3.2.1. Cromosomas sexuales en peces y su evolución

Los cromosomas sexuales se llaman heterocromosomas, un nombre que, como es habitual, está tomado prestado de la nomenclatura



empleada en mamíferos, en los que dichos cromosomas son distintos. De hecho lo son en los machos pero no en las hembras. En los machos se distinguen porque el X y el Y tienen forma y tamaño distinto. En los peces, en cambio, aunque su número modal puede ser parecido o superior al de los mamíferos, los cromosomas son, en general, de un tamaño reducido en comparación (e.g., Bouza *et al.* 1994) y aunque existan los cromosomas sexuales *sensu stricto*, lo cierto es que en la mayoría de casos tienen la misma forma en ambos sexos, es decir, son homomórficos. Los cromosomas sexuales que son distintos se llaman heteromorfos y aunque algunas especies los poseen, no es lo habitual. Además, los heteromórficos pueden recibir este nombre por ser realmente distintos en tamaño o por serlo tras la aplicación de técnicas citogenéticas para establecer sus patrones de tinción (Bouza *et al.*, 1994), por el análisis del complejo sinaptonémico (Carrasco *et al.*, 1999) o por la hibridación con sondas fluorescentes (FISH) (Iturra *et al.*, 1998). La existencia de cromosomas sexuales homomórficos, los más habituales como se ha señalado, se evidencia entonces por métodos indirectos, tales como el estudio de la proporción de sexos en distintas familias, la inducción a la ginogénesis, que debería dar en teoría una progenie 100% hembra en los sistemas cromosómicos tipo XX/XY, o el empleo de individuos tratados con hormonas (ver sección 4.5.1.2).

La formación de cromosomas sexuales se produce por duplicación o translocación de fragmentos de los cromosomas, de forma que se crean zonas en las que se va eliminando progresivamente la recombinación durante la meiosis. Bajo estas circunstancias es como evolucionan las secuencias y genes *ligados al sexo*, alguno de los que llegan a devenir *determinantes del sexo*. Este proceso ha sido descrito por Schartl, 2004a) y aparece ilustrado en la Figura 2A.

En los sistemas multifactoriales hay tres o más cromosomas sexuales, pero con la particularidad de que su número y efecto en el fenotipo puede caracterizarse con precisión. En los peces el caso mejor conocido es el de *Xiphophorus maculatus* en los que hay tres cromosomas sexuales W, X e Y. Sin embargo, cada individuo posee sólo dos de ellos, por lo que algunos autores ven el sistema multifactorial como un caso particular de sistema monofactorial.

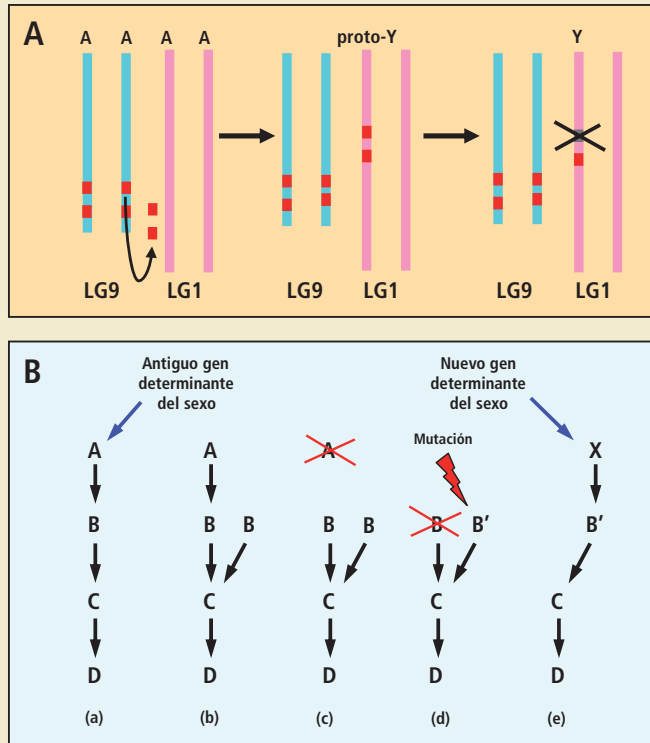


FIGURA 2.

Esquema de la evolución de cromosomas sexuales y genes determinantes del sexo en los peces.

A) Evolución del cromosoma Y de medaka (*Oryzias latipes*). Un segmento de un cromosoma autosómico (A) del grupo de ligamiento 9 (LG9), que contiene varios genes tales como *dmrt1* y *dmrt3*, se duplica y se inserta en un cromosoma distinto, perteneciente a otro grupo de ligamiento distinto (LG1), el cual deviene el proto-Y cromosoma. En el segmento insertado se acumulan transposones, lo que da lugar a una región que no se recombina con la correspondiente de su cromosoma homólogo. Posteriormente, todos los genes excepto *dmrt1bY* (*DMY*) devienen no funcionales por mutación. Modificado de Scharrtl (2004a). **B)** Cambios en los genes implicados en la determinación del sexo. Cada gen activa la transcripción del gen siguiente en la cascada por encima de un cierto umbral, lo que activa la transcripción del siguiente gen por debajo (a). La duplicación del gen B genera una segunda copia con un nivel basal de expresión (b). Los niveles basales de las dos copias del gen B son suficientes para activar a C sin necesidad del concurso de A, que deviene obsoleto (c). Una mutación en una de las copias de B (B') hace que su expresión sea suficiente para activar a C (d). Un gen nuevo se añade a la cascada y es capaz de regular todo el proceso, deviniendo el nuevo determinante del sexo. Modificado de Scharrtl (2004b).



La gran diversidad de los peces se refleja en los mecanismos de determinación sexual, que pueden ser distintos incluso en especies del mismo género e incluso dentro de poblaciones de la misma especie (Tabla 2). La determinación del sexo en grupos de especies de gran importancia en acuicultura, como salmónidos y tilapias, ha sido revisada recientemente por Woram *et al.* (2003) y Cnaani *et al.* (2008), respectivamente.

4.3.2.2. Genes determinantes del sexo y loci ligados al sexo

En los mamíferos existe un gen principal único determinante del sexo llamado *Sry* y lo poseen esencialmente todos los miembros de este grupo. Además, con la excepción de los monotremas, que tienen cromosomas sexuales múltiples, todos los mamíferos determinan el sexo por un sistema XX/XY (hembras:machos) (Ezaz *et al.*, 2006). A pesar de un intenso esfuerzo de investigación, en las aves, con un único sistema determinante del sexo del tipo WZ/ZZ (hembras:machos), todavía no se ha descubierto ningún gen determinante del sexo, y es posible que el día que se descubra se evidencie que está presente en todos los miembros de este grupo. Los anfibios tienen ambos sistemas, XX/XY y WZ/ZZ, con posibilidad de cromosomas múltiples, y los reptiles también, además de ESD, pero en ninguno de estos dos grupos de vertebrados se conoce tampoco cual es el gen determinante del sexo y no se sabe si es único o hay varios.

En general, los genes implicados en la determinación del sexo en los mamíferos o bien no se encuentran en los peces o, si lo hacen, no están asociados a ningún sexo en particular (Husebye *et al.*, 1994). El único gen determinante del sexo conocido en vertebrados distinto a *Sry* fue descubierto en los peces, concretamente en la especie *Oryzias latipes* de forma independiente por dos equipos en 2002 y, fiel a la tradición que parece empeñada en confundir a los lectores, recibe tres nombres distintos: *DMY*, *DMRT1Y* o *dmrt1bY* (Matsuda *et al.*, 2002; Nanda *et al.*, 2002; Scharf, 2004a). *DMY* es un gen de reciente evolución (< 10 millones de años) (Zhang, 2004). Su función parece estar relacionada con la inhibición de la proliferación celular de las células germinales (Herpin *et al.*, 2007). En estudios posteriores se determinó que otras especies del mismo género no poseían este gen (Kondo *et al.*, 2003; Volff *et al.*, 2003), por lo que se llegó a la conclusión de que en los peces los



genes determinantes del sexo han evolucionado muchas veces distintas y su número o formas de presentarse puede ser muy elevado. Estudios recientes por pérdida (Paul-Prasanth *et al.*, 2006) o ganancia de función (Matsuda *et al.*, 2007) han demostrado firmemente que DMY es el gen «máster» determinante del sexo en *Oryzias latipes*.

Los genes determinantes del sexo pueden evolucionar de varias formas (Matsuda, 2003; 2005; Woram *et al.*, 2003), siendo una de ellas por mutaciones en alguno de los componentes de la cascada de genes implicados en la determinación del sexo (Schartl, 2004b; Fig. 2B). En resumen, para ninguna especie de pez de importancia para la acuicultura se conoce cual es el gen determinante del sexo. Visto en perspectiva, el único gen determinante del sexo conocido en peces hasta la fecha está presente en... sólo dos de las cerca de 28.000 especies de peces!

Sin embargo, ello no ha sido obstáculo para que la región determinante del sexo o ligada al sexo empiece a ser conocida en algunas especies modelo: *Xiphophorus maculatus* (Froschauer *et al.*, 2002), *Gasterosteus aculeatus* (Griffiths *et al.*, 2000; Peichel *et al.*, 2004) y *Takifugu rubripes* (Cui *et al.*, 2006; Kikuchi *et al.*, 2007), así como especies interesantes para la acuicultura tales como el salmón del Pacífico, *Oncorhynchus tshawytscha* (Devlin *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 2001), pez gato, *Ictalurus punctatus* (Liu *et al.*, 1996), tilapia del Nilo, *Oreochromis niloticus* (Lee *et al.*, 2003) y trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Felip *et al.*, 2005).

Como se ha visto, muchas especies de peces están en los primeros estadios de la diferenciación de los cromosomas sexuales y muchas tienen un sistema monofactorial de determinación del sexo tipo XX/XY o WZ/ZZ. Esta situación es propicia para la identificación de marcadores ligados al sexo y eventualmente los propios genes determinantes del sexo.

Se da una paradoja en cuanto a la dificultad de aislar secuencias específicas de cada sexo y eventualmente el gen determinante del sexo. En especies con una avanzada o marcada diferenciación de cromosomas sexuales existe una importante cantidad de secuencias repetidas que se han ido acumulando alrededor del gen determinante del sexo, lo que hace muy difícil y laborioso su aislamiento final (Li *et al.*, 2002). Sin embargo, las especies con poca diferenciación de sus cromosomas



sexuales porque están todavía en un estadio temprano de evolución parecen ser más favorables al aislamiento de marcadores sexo-específicos. Así, puede ser más fácil aislar los genes determinantes del sexo en especies con sistemas monofactoriales pero sin cromosomas sexuales heteromorfos (Penman y Piferrer, 2008).

4.3.2.3. Sistemas polifactoriales

En los sistemas polifactoriales el sexo se determina por el efecto de muchos factores menores, algunos estimulando la diferenciación del sexo femenino y otros la del masculino (Fig. 3). El sexo resultante depende de la combinación de dichos factores.

Estos factores están distribuidos en todo el genoma y son difíciles de caracterizar, cada uno con pequeño efecto aditivo, quizá con alguno actuando de forma epistática sobre los otros. En estos casos no hay cromosomas sexuales como tales. Dependiendo de la segregación de estos factores sexuales durante la meiosis, cada gameto será portador de una dotación particular, por lo que en las especies que poseen este tipo de determinación sexual es característica la fluctuación de las proporciones de sexos en distintas puestas originadas de los mismos reproductores, así como la existencia de efectos parentales y de interacciones genotipo-ambiente. Algunos autores consideran los sistemas polifactoriales como los más primitivos en peces, a partir de los que evoluciona en una dirección ESD y, en la otra, sistemas GSD basados en factores principales (Bull, 1983; Rice, 1986).

4.3.3. Determinación sexual ambiental

En la determinación ambiental del sexo (ESD) cambios en una variable ambiental determinan el sexo de los individuos, la variable ambiental pudiendo ser cualquiera. La principal diferencia con GSD es que en la ESD no hay diferencias genéticas *consistentes* entre los sexos, y que la *primera* diferencia entre sexos viene dada por diferencias en el valor de una variable ambiental. En este caso el sexo no se determina hasta después de la eclosión de los huevos durante un periodo del desarrollo que es distinto para cada especie pero que acostumbra a coincidir con los estadios larvarios y postlarvarios de estos animales. Comparado con GSD, ESD ha sido mucho menos estudiada aunque constituye un



claro caso de plasticidad fenotípica en animales (distintos fenotipos a partir de un mismo genotipo). En los vertebrados se da sólo en los peces y reptiles. Se ha afirmado que los factores ambientales capaces de determinar el sexo incluyen la temperatura, pH, fotoperiodo y salinidad (Devlin y Nagahama, 2002), pero como se verá a continuación en muchos casos la evidencia es muy circunstancial y con razonable

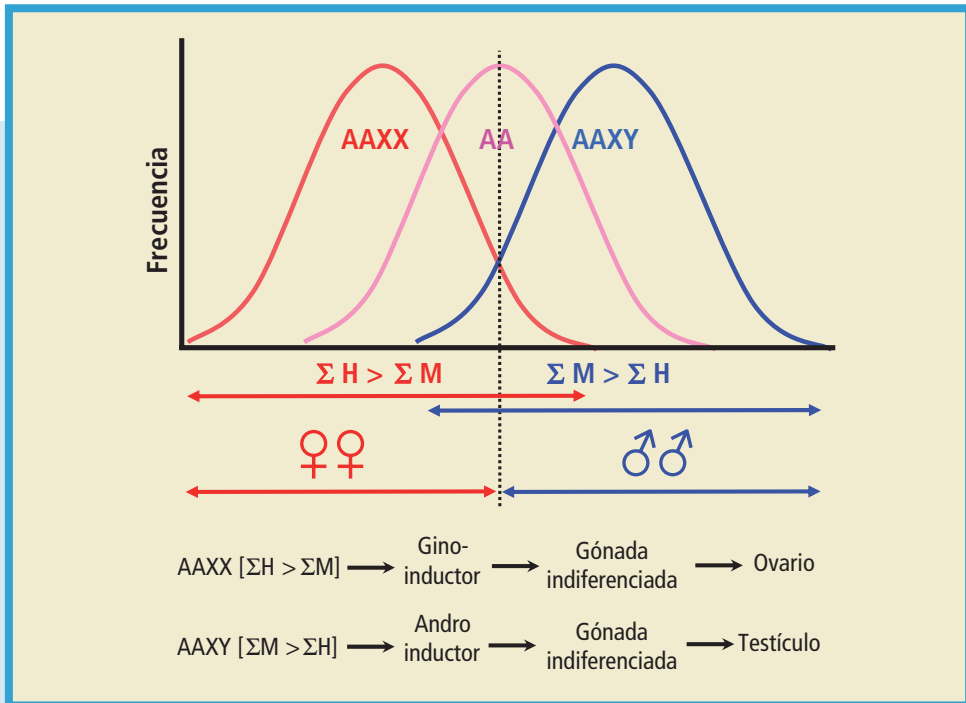


FIGURA 3.

Esquema de un sistema mixto en el que se combina la determinación del sexo por factores principales presentes en los cromosomas sexuales (XX/XY) junto con factores menores presentes en los autosomas (AA). Si la suma de los efectos de factores determinantes del sexo femenino (H) es mayor que la de los determinantes del sexo masculino (M) se produce la síntesis de un ginoinductor (hormonas femeninas) y se desarrollan ovarios, y en caso contrario testículos. La línea vertical de puntos indica el umbral que separa a los dos sexos fenotípicos. Obsérvese que hay una zona de solapamiento en los efectos de los factores, lo que posibilita la existencia de individuos con sexo fenotípico distinto a su sexo genotípico. Este esquema puede aplicarse también a un sistema polifactorial sin influencias de factores principales. Adaptado de Yamamoto (1969).



certeza sólo se han podido verificar efectos de la temperatura y, en menor grado, del pH.

La aparición de ESD precisa de una serie de condiciones conocidas como el modelo de Charnov y Bull (Charnov y Bull, 1977). Según este modelo, el mecanismo de determinación del sexo de una especie devendrá ESD si se cumplen las siguientes condiciones: 1) Ambiente desigual durante las etapas tempranas de la vida, de forma que variaciones del ambiente afectan de forma distinta las posibilidades de supervivencia y reproducción («fitness») de machos y hembras, 2) Pequeño o ningún control de los padres y las crías sobre la selección del ambiente en donde se desarrollarán, y 3) los adultos de distintos ambientes se cruzan al azar.

4.3.3.1. Determinación del sexo dependiente de la temperatura

La determinación del sexo dependiente de la temperatura (TSD) es un caso particular de ESD en donde la temperatura ambiente durante periodos sensibles del desarrollo es capaz de determinar el sexo fenotípico de forma irreversible. Siguiendo investigaciones en reptiles, en donde este tipo de determinación sexual es muy común (Pieau, 1996), se llevaron a cabo estudios en peces y se encontró que TSD estaba presente en al menos 8 familias de peces gnatóstomos y una especie de agnato (Devlin y Nagahama, 2002). Se afirmó también la presencia de TSD en algunas especies de peces cultivadas (Baroiller y D'Cotta, 2001). Hasta la fecha, TSD se había señalado de forma implícita o explícita en 59 especies de peces. La primera evidencia se encontró en el pejerrey del Atlántico, *Menidia menidia* (Conover y Kynard, 1981), en donde altas temperaturas durante el periodo termosensible resultan en una mayor proporción de machos.

En los peces, además, son frecuentes las interacciones genotipo-ambiente en lo que se refiere a la determinación sexual. En *M. menidia*, por ejemplo, distintas poblaciones poseen un sistema GSD sin influencia del ambiente, mientras que en otras TSD llega a representar el 70% de la variación observada en proporciones de sexos (Lagomarsino y Conover, 1993). Cambios en la sensibilidad o respuesta a la temperatura han sido observados también en especies con sistema de



determinación polifactorial con influencia del ambiente, tal y como es el caso de la lubina (Mylonas *et al.*, 2005).

Similar a la situación en los reptiles, en los peces se habían descrito tres normas de reacción o patrones de cambios en las proporciones de sexos en respuesta a la temperatura (Strüssmann y Patiño, 1999; Baroiller *et al.*, 1999; Baroiller y D'Cotta, 2001; Devlin y Nagahama, 2002; Godwin *et al.*, 2003; Conover, 2004): el número de machos, 1) aumenta con la temperatura, 2) disminuye con la temperatura y 3) aumenta en los extremos de temperatura y se aproxima a 1:1 a temperaturas intermedias. El número de especies de peces con TSD que había sido asignado a cada patrón era de 53-55, 2-4 y 2, respectivamente (Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008).

Una cuestión muy importante sobre TSD en los peces es su incidencia. La opinión predominante hasta ahora era que TSD era muy común y que nuevas especies con TSD se irían encontrando a medida que nuevas observaciones se llevasen a cabo. (e.g., Hattori *et al.*, 2007). Por otro lado, otros autores habían señalado que en la gran mayoría de casos la evidencia de TSD se había obtenido en experimentos de laboratorio con temperaturas que la especie en cuestión raramente experimenta en la naturaleza (Conover, 2004). Así, no todos los casos de TSD parecían reales (e.g., Tessema *et al.*, 2006). Con la excepción de *M. menidia* y *M. peninsulæ*, toda la evidencia sobre TSD ha sido obtenida en el laboratorio. Algunas investigaciones de laboratorio con especies relacionadas tales como el pejerrey de Argentina, *Odontesthes bonariensis*, establecieron fehacientemente la presencia de TSD en dichas especies (Strüssmann *et al.*, 1996).

Valenzuela *et al.* (2003) propusieron un método para evaluar la presencia de TSD en peces. Este método recientemente ha sido modificado para incorporar también los criterios de Conover (2004) (Fig. 4A) y ha sido aplicado en un estudio que incluye las citadas 59 especies para las que se había supuesto la presencia de TSD. En esencia, se determinó si existían evidencias directas o indirectas de la presencia de cromosomas sexuales, que caso de existir son reflejo de que la especie posee GSD y no TSD, y ver si las temperaturas usadas para obtener una respuesta son ecológicamente relevantes. Los resultados muestran en primer lugar que TSD es claramente la excepción en peces. Es decir, un



mecanismo derivado que ha aparecido algunas veces de forma independiente, pero que en cualquier caso es minoritario y comprende a 40 especies (Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008). Si se tiene en cuenta que de éstas, 33 pertenecen al mismo género (*Apistogramma*, unos Cíclidos sudamericanos), entonces es evidente que en la mayoría de casos en donde se había supuesto TSD lo que en realidad está operando es un mecanismo de GSD. El uso de temperaturas fuera del rango que la especie experimenta durante el periodo termosensible había llevado a postular la presencia de TSD en especies que en realidad no lo tienen. Por otro lado, se demostró que sólo existe en peces el patrón 1 de respuesta de la proporción de sexos a la temperatura, es decir, un mayor número de machos con el aumento de temperatura (Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008). La figura 4B ilustra el cambio en la proporción de sexos en especies con GSD, GSD+TE y TSD. Puede observarse que para que una especie posea TSD el cambio en la proporción de sexos debe producirse en el rango de temperaturas que dicha especie experimenta *normalmente* en la naturaleza. Además, se calculó que cambios de entre 1.5 y 4°C en la temperatura del agua, tal y como están revistos que ocurran a lo largo de este siglo como consecuencia del cambio climático, son capaces de modificar la proporción de sexos hasta 3:1 (machos:hembras) en algunos casos (Ospina-Álvarez y Piferrer, 2008). Estos resultados modifican algunas especulaciones realizadas anteriormente sobre la evolución de los mecanismos de determinación sexual en los peces (Mank *et al.*, 2006).

Otra cuestión importante es esclarecer el mecanismo molecular mediante el cual la temperatura afecta a la proporción de sexos dentro del contexto de la preocupación de cómo el ambiente controla y regula la expresión génica (Gilbert, 2005). Este mecanismo muy probablemente afecta a la aromatasa, el enzima que convierte a los andrógenos en estrógenos (ver sección 4.4.3.2.1), y es aplicable no sólo a peces sino, como mínimo, a reptiles, los otros vertebrados que junto con los peces presentan TSD. Se ha visto que exposición a temperaturas más altas de lo normal aumentan la proporción de machos (de acuerdo al patrón 1 observado) en un número variado de especies y que esta respuesta tiene en común una inhibición de la expresión de la aromatasa. Ello, por ejemplo, se ha observado en el fletan japonés, *Paralichthys olivaceus*



(Kitano *et al.*, 1999), tilapia del Nilo (Kwon *et al.*, 2000; D'Cotta *et al.*, 2001a), pez cebra, *Danio rerio* (Uchida *et al.*, 2004) y lubina (Blázquez *et al.*, 2009). Investigaciones recientes en nuestro laboratorio indican que el mecanismo molecular podría involucrar un silenciamiento del gen de

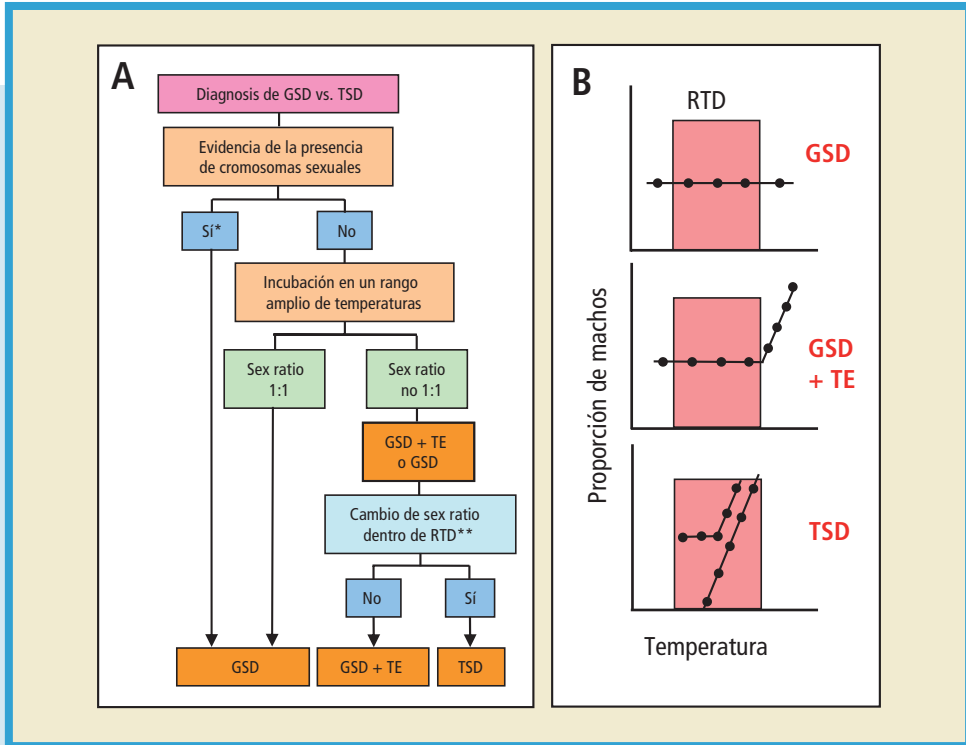


FIGURA 4.

Determinación del sexo dependiente de la temperatura (TSD). **A)** Algoritmo para esclarecer si el mecanismo de determinación sexual de una especie es genotípico (GSD), dependiente de la temperatura (TSD) o genotípico con influencias ambientales (GSD + TE). *Indica que los cromosomas pueden ser homomórficos o heteromorfos; **RTD, rango de temperaturas en el medio durante el periodo termosensible. **B)** Normas de reacción de la proporción de sexos (aquí expresado como proporción de machos) en función de la temperatura en especies con GSD, GSD + TE y TSD. El área sombreada indica el rango de temperaturas en el medio natural que el animal experimenta durante la etapa del desarrollo que comprende el periodo termosensible (RTD). Para que el mecanismo de determinación sexual de una especie sea catalogado de TSD el cambio de la proporción de sexos en respuesta a la temperatura debe producirse dentro del RTD. Adaptado de Ospina-Álvarez y Piferrer (2008).



la aromatasa originado por una metilación de dinucleótidos CG en su promotor, de forma que sería un mecanismo epigenético de interacción ambiente-genoma controlando un carácter fenotípico esencial como es el sexo (Navarro-Martín *et al.*, 2007).

4.3.3.2. El pH y otros factores ambientales

Tras la temperatura, el pH del agua es el único factor para el que ha sido demostrada una influencia clara en la determinación del sexo en peces, aunque su efecto es menos pronunciado. La influencia del pH fue demostrada en varias especies tropicales de pequeño tamaño (Rubin, 1985). En un estudio muy completo, Römer y Beisenherz (1996) mostraron una mayor producción de hembras a pH bajos en más de 30 especies de Cíclidos del género *Apistogramma*. La respuesta en la proporción de sexos según el pH puede tener valor adaptativo en especies que están expuestas a fuertes cambios estacionales de precipitación (por ejemplo, debido a los monzones en el SE asiático), como una estrategia para producir el sexo que puede sacar mejor partido a unas condiciones ambientales determinadas.

Hay otras variables ambientales que se han estudiado por su posible influencia en la proporción de sexos, demostrándose normalmente la ausencia de tales efectos. Este es, por ejemplo, el caso del fotoperiodo en la lubina (Blázquez *et al.*, 1998a) o la salinidad en la tilapia (Abucay *et al.*, 1999) y lubina (Saillant *et al.*, 2003a). En otros casos, puntualmente se ha afirmado la existencia de tal o cual factor ambiental sobre una especie dada. Sin embargo, sin estudios independientes y más detallados es demasiado arriesgado dar por establecida la existencia de dichos efectos. Es muy probable que, tal y como se ha comentado más arriba en relación a la temperatura, muchos de estos efectos se hayan obtenido sometiendo a las especies a condiciones que jamás o raramente experimentan en la naturaleza, por lo que su relevancia ecológica y, por tanto, su valor adaptativo, es más que discutible.

4.3.4. Sistemas mixtos

Algunas especies parecen tener sistemas mixtos, consistentes en la combinación de GSD y TSD. Es más, algunas poblaciones de la misma especie pueden tener GSD, otras TSD y aún otras una mezcla de ambas. Este



escenario fue descrito para *M. menidia* (Lagomarsino y Conover, 1993). ¿Es ello realmente posible? Hay un cierto debate sobre este punto. Así, por un lado, algunos autores consideran que GSD y TSD son dos extremos de un patrón continuo con muchas gradaciones y reflejo de un proceso (la determinación del sexo) que también es continuo (Sarre *et al.*, 2004). Otros, en cambio, están de acuerdo que el patrón observado es ciertamente continuo, pero que el proceso que lo origina (el mecanismo de determinación sexual) es o bien genotípico o ambiental (Valenzuela *et al.*, 2003) si uno se ciñe al significado de la definición de determinación del sexo: la primera diferencia durante la ontogénesis entre dos sexos. Así, en una especie con GSD la primera diferencia entre sexos será la presencia en el cigoto de factores distintos (sistemas basados en la herencia de factores sexuales mayores) o combinaciones de factores mayores con menores según el sexo (sistemas mono- o multifactoriales con influencias autosómicas), o bien diferencias de contenido en numerosos factores menores (sistemas polifactoriales). Por el contrario, la primera diferencia ontogenética en una especie con TSD es la diferencia en factores ambientales.

Un concepto distinto es la existencia de especies con un sistema GSD que por no ser suficientemente robusto esté expuesto a fluctuaciones ambientales, de forma que la proporción de sexos secundaria o terciaria no coincida con la primaria, no por mortalidad o predación ligada al sexo, sino porque durante la diferenciación sexual ésta se ve afectada por el ambiente, lo que desemboca en la presencia de animales con sexo fenotípico distinto a su sexo genotípico. Estos casos se refieren como especies GSD + EE (de GSD + environmental influences) porque a pesar de que el ambiente afecta a la proporción de sexos la determinación del sexo inicial sigue siendo GSD (Bull, 1983; Valenzuela *et al.*, 2003). Este escenario es frecuente en especies con GSD polifactorial y un buen ejemplo de ello es la lubina, *Dicentrarchus labrax* (Saillant *et al.*, 2002; Piferrer *et al.*, 2005; Saillant *et al.*, 2006; Vandeputte *et al.*, 2007).

4.3.5. El sexo como una dicotomía marcada por el umbral de un carácter continuo

Si exceptuamos a algunos organismos unicelulares, en la mayoría de seres vivos hay sólo dos sexos y es bien conocido el hecho que la proporción de sexos sigue una distribución binomial. Menos aparente es el



hecho de que ambos sexos puedan ser considerados el producto de un carácter continuo, de forma que los individuos que alcanzan un cierto umbral en un tiempo determinado se desarrollan como un sexo y los que quedan por debajo de dicho umbral lo hacen como el sexo opuesto. En particular, se hace énfasis en tasas de desarrollo asociadas a la determinación de un sexo, normalmente los machos con mayores tasas de desarrollo. Esta visión ha sido propuesta con distintos matices y de forma independiente por varios autores, habiendo de destacar las contribuciones de Bogart (1987), Kraak y De Looze (1993) y Mittwoch (2006).

Esta es una área que decididamente merece mucha más atención que la que ha recibido hasta ahora. Por su condición de animales poiquilotermos en los que con una simple manipulación de la temperatura se puede afectar el desarrollo, los peces proporcionan un campo de trabajo excelente para profundizar en estas cuestiones. En la lubina, por ejemplo, ya hace tiempo que se demostró una clara asociación entre el crecimiento –o, más estrictamente, el tamaño alcanzado a una determinada edad– y la diferenciación sexual, de forma que antes de llegar al año de edad los individuos más grandes suelen ser hembras y los más pequeños machos (Blázquez *et al.*, 1999). De hecho, esta característica se ha explotado para la obtención de poblaciones enriquecidas con un determinado sexo para fines científicos mediante la aplicación de clasificaciones por talla (Papadaki *et al.*, 2005). Recientemente, se ha observado que distintas tasas de alimentación y, por tanto, de crecimiento influyen en la proporción de sexos en el pez cebra (Lawrence *et al.*, 2008). Es posible que este fenómeno sea más extenso de lo que parece y resulta pues interesante dirigir investigaciones en este sentido.

4.3.6. Esclarecimiento de los mecanismos de determinación sexual

Con la industrialización creciente del proceso de producción en acuicultura es necesario disponer de reproductores genotipados para poder desarrollar planes de mejora en los que, en primer lugar, la información del sexo de los animales antes de que sea aparente externamente sirve para canalizar adecuadamente la selección. En segundo lugar, una adecuada gestión de la proporción de sexos operacional es



necesaria para optimizar los lotes de reproductores. Por otro lado, el aumento del número de especies de interés para la acuicultura hace necesario saber si una especie nueva es gonocorista o hermafrodita. En el primer supuesto es importante saber si existe un dimorfismo sexual en crecimiento y edad de primera madurez sexual. En el segundo, conocer la polaridad del cambio de sexo y la edad o tamaño en que éste se produce para anticipar como puede afectar a la producción y gestión de los lotes. De todo ello se deduce que el conocimiento de los mecanismos de determinación y diferenciación sexual es cada vez más importante en la acuicultura moderna.

Existen una serie de métodos para esclarecer qué mecanismo de determinación sexual posee una especie, que pueden agruparse en directos e indirectos. Los métodos directos incluyen el análisis citogenético, determinando si el número y forma de los cromosomas es igual entre los dos sexos. Caso de no serlo, ello sería muy probablemente indicativo de un sistema monofactorial con machos o hembras heterogaméticos. En el caso de no existir tales diferencias entre sexos, lo más esperable en peces, un sistema monofactorial no puede descartarse pero existe la posibilidad de la existencia de un sistema multi- o polifactorial.

Otros métodos directos incluyen la identificación de bandas o secuencias ligadas al sexo. Con métodos de tinción específicos podría descubrirse la existencia de diferencias en el patrón de bandas entre sexos, lo cual ayudaría a su identificación. Finalmente, las sondas moleculares pueden permitir identificar secuencias determinantes del sexo o ligadas al sexo. Un *marcador ligado al sexo* es una secuencia localizada en el mismo cromosoma en donde se encuentran el gen o genes que determinan el sexo y por lo tanto la recombinación puede todavía ocurrir entre los dos loci, alterando el patrón de ligamiento entre alelos. Por el contrario, un *marcador específico del sexo* está tan próximo al gen determinante del sexo (puede incluso llegar a ser el mismo) que ya no ocurre recombinación y por lo tanto se asocia siempre a un sexo determinado.

Por otro lado, los métodos indirectos incluyen el análisis de la proporción de sexos en varias familias o el análisis de la progenie de familias obtenidas cruzando a un individuo tratado hormonalmente para cambiar su sexo fenotípico respecto a su sexo genotípico, así como la



inducción de la ginogénesis. Sexos variables entre distintas familias de la misma especie sugieren una componente parental en la determinación del sexo, posiblemente reflejo de un sistema de factores mayores con loci secundarios o de un sistema multifactorial con varios factores. Si, además, se observan diferencias en la proporción de progenies originadas a partir de cruces sucesivos usando los mismos reproductores, ello es indicativo de la presencia de un sistema polifactorial con o sin la influencia del ambiente (Vandeputte *et al.* 2007).

TABLA 3.

Esclarecimiento de mecanismos de determinación sexual mediante la generación de familias y el sometimiento de una porción de los miembros de cada familia a distintas condiciones ambientales.

Resultados observados	Efectos parentales	Efectos ambientales	Mecanismo deducido
Todas o la mayoría de familias con proporciones de sexos cercanas a 1:1 en todas las temperaturas	No	No	GSD monofactorial (GSD pura)
Variación de las proporciones de sexos entre familias pero no de una familia bajo distintas condiciones ambientales	Sí	No	GSD polifactorial
Variación de la proporción de sexos según las condiciones ambientales pero poca o nula variación entre familias bajo una misma condición ambiental	No	Sí	ESD con baja influencia genética (ESD pura)
Variación de la proporción de sexos entre familias y entre distintas condiciones ambientales dentro de una familia	Sí	Sí	ESD con alto efecto genético y ambiental (interacción genotipo-ambiente)

Abreviaciones: GSD, determinación del sexo genotípica. ESD, determinación del sexo ambiental.

Para una especie en la que no se tengan indicios de cual puede ser el mecanismo de determinación sexual pueden tomarse reproductores de ambos sexos y generar cruces para crear varias familias, dividiendo los miembros de cada una de ellas en tanques distintos sometidos a distintas condiciones ambientales, por ejemplo de temperatura. Una aproximación como la descrita puede generar varias posibilidades y según cual sea el resultado se puede deducir en que grado la determinación del sexo es genotípica, ambiental o una mezcla de ambas (Tabla 3).



4.4. DIFERENCIACIÓN SEXUAL

4.4.1. Definición

La diferenciación sexual² es el proceso mediante el cual un rudimento gonadal ya formado pero sexualmente indiferenciado se transforma en un ovario o un testículo. Este proceso está controlado por una serie de mecanismos moleculares y fisiológicos que se traducen en los cambios morfológicos que pueden observarse. A nivel morfológico, la diferenciación sexual comienza con la aparición de la primera diferencia en gónadas rudimentarias que permita clasificar a los individuos en dos grupos en función de estas diferencias. A nivel bioquímico o molecular, el concepto es el mismo aunque las diferencias implican cambios en el contenido de alguna sustancia, por ejemplo, de los esteroides sexuales (ver sección 4.4.3.1), si se contempla la diferenciación desde un punto de vista bioquímico, o de la expresión de algún gen importante para el proceso como es la aromatasa (ver sección 4.4.3.2.1), si se hace desde un punto de vista molecular. Es difícil precisar cuando termina la diferenciación sexual, pero se puede tomar como señal un testículo en el cual las células germinales son todas espermatogonias (no ha empezado aún la meiosis) y están perfectamente identificadas las células somáticas. Además, es posible empezar a distinguir la formación de los túbulos seminíferos. En las hembras, la entrada en meiosis es muy temprana, y es habitual observar las células germinales entrando en meiosis cuando el ovario todavía se está formando.

La diferenciación sexual da como resultado la formación de un macho o de una hembra a partir de un cigoto de un genotipo determinado producido por unos padres concretos en un ambiente dado (Bull, 1983). Junto con la determinación sexual, la diferenciación sexual de todos los individuos de una población, unos en machos, otros en hembras, producen la proporción de sexos de la misma.

² Aquí se refiere a la gonadal, puesto que se puede hablar de la diferenciación sexual de cerebro, que no será tratada en este capítulo.



4.4.2. Aspectos morfológicos

4.4.2.1. Relación sistema excretor-reproductor y primeros estadios

Morfológica y embriológicamente el sistema reproductor está íntimamente relacionado con el sistema excretor. Hay importantes diferencias estructurales entre los distintos tipos de peces, considerando a los agnatos en un extremo y a los teleósteos en el otro. En los ciclóstomos (lampreas) el conducto de Wolff conduce la orina mientras que la gónada descarga directamente en el celoma y los gametos salen al exterior por un poro urogenital que conecta con el citado conducto. En los teleósteos hembra, el ovario descarga los gametos a través de un gonostoma hacia el conducto de Müller, el cual se junta con el conducto de Wolff en el seno urogenital. Sin embargo, el gonostoma está ausente en algunos teleósteos (anguila, salmónidos). Por el contrario, en los teleósteos macho el conducto de Müller ha desaparecido y los gametos masculinos se descargan por el conducto de Wolff, mientras que la orina se descarga por un conducto accesorio de nueva formación. Todos estos conductos convergen en una cloaca. Así, en los teleósteos, los conductos de Wolff transportan orina en las hembras pero mayoritariamente espermatozoides en los machos. Una descripción pormenorizada de estas relaciones morfológicas está fuera del ámbito de este capítulo, pero se puede encontrar en tratados de zoología (e.g., Grassé, 1957) o de anatomía comparada (e.g., Weichert y Presch, 1981).

4.4.2.2. Etapas del proceso morfológico de la diferenciación sexual

El proceso de diferenciación sexual puede dividirse en dos grandes etapas: Etapa 1, gónada indiferenciada, que a su vez comprende dos periodos: Periodo 1, estadio pregonadal con las siguientes fases: a) Aparición de las células primordiales germinales (PGC), b) migración de las PGC a través del cuerpo hacia la región cercana del mesonefros, y c) concentración de las PGC en el epitelio celómico, alrededor del lugar donde se va a formar la futura cresta germinal. El proceso de diferenciación sexual a partir de este momento está ilustrado en la figura 5.



La gónada se forma a la altura del mesonefros en un corte sagital (Fig. 5A). Periodo 2, formación de la gónada con las siguientes fases: a) Formación de las crestas germinales por proliferación del epitelio celómico hacia el interior de la cavidad celómica (Fig. 5B), y b) migración de las PGC al interior de las crestas germinales. Etapa 2, diferenciación propiamente dicha, que morfológicamente puede ser histológica o citológica. En la diferenciación sexual histológica la primera diferencia entre sexos se da por cambios en la apariencia la forma de la gónada o de alguna de sus partes (Fig. 5C). Por ejemplo, en la tilapia del Nilo las futuras hembras se distinguen porque empieza la formación de la cavidad ovárica por evaginación, mientras que en el mismo periodo en los futuros machos no hay cambio aparente. Los cambios histológicos de los futuros machos se observan muchas veces con la formación del sistema vascular del testículo, consistente en la arteria gonadal, la vena gonadal y el espemiducto. Por el contrario, en la diferenciación citológica las diferencias se observan en algún tipo celular particular. Por ejemplo, en el salmón del Pacífico las hembras se distinguen de los futuros machos porque las células germinales entran en la profase de la primera división meiótica comenzando así la gametogénesis cuando la diferenciación sexual aún no ha terminado. Cuando están en esta fase las PGC reciben el nombre de gonocitos, es decir, las células germinales ya no tienen las características morfológicas de primordiales, pero tampoco se pueden distinguir entre espermatogonias y oogonias. En los machos de otras especies como la tilapia, cambios citológicos observados mejor al microscopio electrónico incluyen la apariencia de células muy ricas en mitocondrias y retículo endoplasmático liso, indicativo de que se trata de células esteroideogénicas.

Aquí es interesante señalar que en los vertebrados la gónada embrionaria consta de dos zonas: corteza y médula. La corteza representa la cresta gonadal acabada de mencionar, de naturaleza epitelial, mientras que la medula es parénquima de la zona entre la cresta y el mesonefros. En todos los vertebrados excepto los teleósteos (o sea, incluyendo también a los elasmobranquios), el desarrollo de la corteza a expensas de la médula es señal de diferenciación ovárica, mientras que el desarrollo de la medula respecto al de la corteza lo es de diferenciación testicular. En los peces teleósteos, tanto el ovario como el testículo

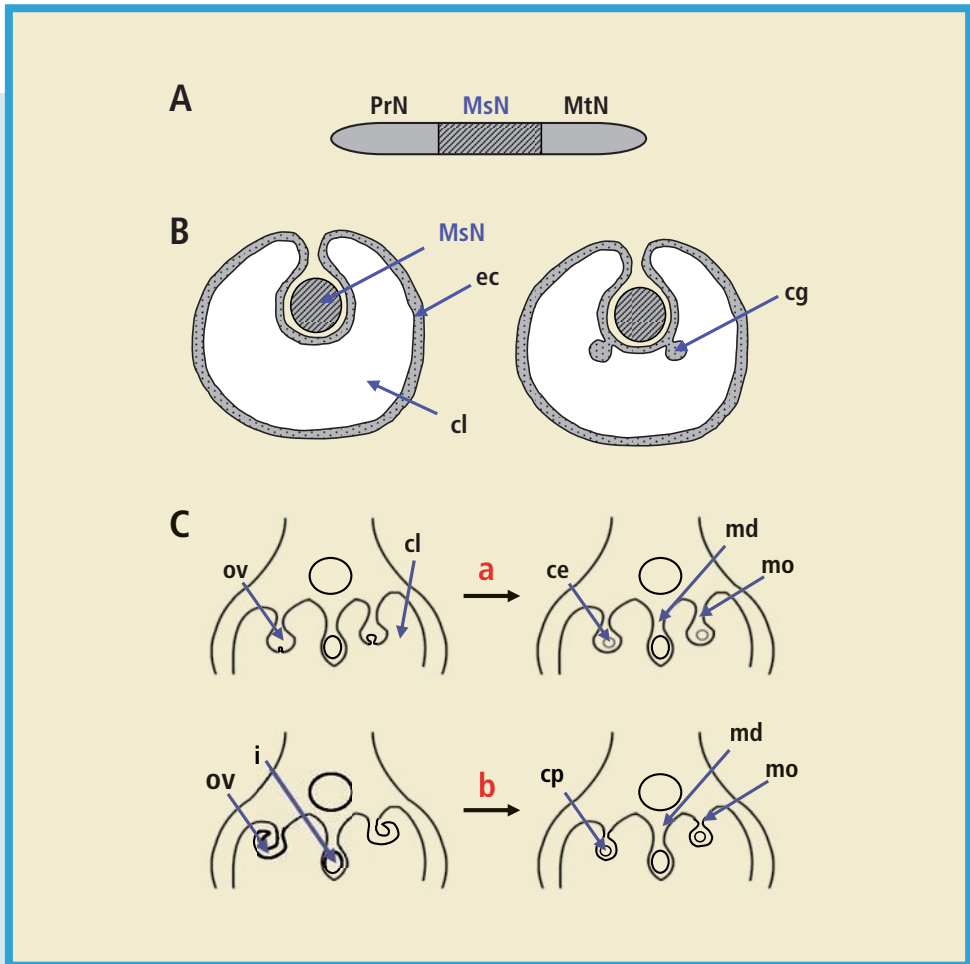


FIGURA 5.

Esquema de la formación de las gónadas de los peces y su relación con el sistema excretor. **A)** Regiones del riñón embrionario de los peces en un corte sagital, indicando el pronefros (PrN), mesonefros (MsN) y metanefros (MtN). **B)** Formación de las crestas gonadales como una expansión del epitelio celómico en la proximidad del mesonefros. **C)** Diagrama en que se muestran dos formas de formación de la cavidad ovárica de los teleósteos: formación de la cavidad entovárica por invaginación (a) y formación de la cavidad provárica por evaginación (b). Abreviaciones: cl, celoma; ce, cavidad entovárica; cg, cresta germinal; cp, cavidad provárica; ec, epitelio celómico; i, intestino; md, mesenterio dorsal; mo, mesovario; ov, ovario. En los machos el mesenterio gonadal se llama mesorquio y en las hembras mesovario. Modificado de Weichert y Presch (1981).



derivan de la zona cortical de la gónada indiferenciada. Esta particularidad se ha intentado relacionar con la labilidad sexual característica de estos animales, o bien con la existencia de un mayor número de especies protogíneas que proterándricas como reflejo de este origen embriológico único de las gónadas de los teleósteos.

En algunas especies el crecimiento de las gónadas va en dirección cefalocaudal (e.g., salmónidos), mientras que en otras es caudocefálico (e.g., lubina). Los principales tipos celulares gonadales de acuerdo a su función, así como la diferenciación histológica vs. citológica están resumidos en la Tabla 4. Actualmente, existe la metodología de ablación de células y marcado específico de una línea celular determinada, que permite su trazado durante el desarrollo (Nakamura *et al.*, 2006), o comprobar los efectos de la eliminación de un tipo en particular (Slanchev *et al.*; 2005), lo que sin duda ayudará significativamente a establecer la base molecular y celular de los cambios morfológicos observados durante la diferenciación sexual.

TABLA 4.
Principales tipos celulares gonadales y diferenciación histológica vs. citológica.

Órgano	Línea somática		Línea germinal	Diferenciación histológica	Diferenciación citológica
	Soporte	Esteroidogénesis			
Testículo	Sertoli	Leydig	Espermatogonia → espermatocito primario → espermatocito secundario → espermatida → espermatozoide	Formación del sistema vascular	Aparición de células esteroidogénicas en la línea somática
Ovario	Granulosa	Teca	Oogonia → oocito primario → oocito secundario → oótida → huevo	Formación de la cavidad ovárica	Células germinales en meiosis

El ovario acostumbra a estar estructurado en láminas que dejan un espacio central hueco llamado cavidad ovárica. Ésta se puede formar por invaginación, dando lugar a un cavidad llamada entovárica, o por evaginación, dando lugar a una cavidad llamada prosovárica (Fig. 5C). En algunos peces tales como los salmónidos la cavidad ovárica está presente sólo durante la formación del ovario, siendo ausente en las hembras adultas, las cuales descargan los huevos dentro de la cavidad celómica.



4.4.2.3. Patrones. Especies diferenciadas e indiferenciadas

Las especies gonocoristas siguen dos patrones según como se formen las gónadas. En las gonocoristas llamadas diferenciadas la gónada indiferenciada se transforma directamente en ovario o testículo, según el animal sea hembra o macho, respectivamente. Ejemplos de ellas son la lubina, salmón y rodaballo. Por el contrario, en las especies gonocoristas llamadas indiferenciadas en todos los individuos la gónada indiferenciada pasa por una etapa de diferenciación pseudo-ovárica. Posteriormente, aproximadamente la mitad de ellos siguen la diferenciación ovárica para convertirse en hembras, mientras que en la mitad restante el incipiente ovario se atrofia por apoptosis (Uchida *et al.*, 2002) para dejar paso a la diferenciación testicular. Ejemplos de ellas son la anguila y el pez cebra. Debido a que existe un breve periodo de su desarrollo en el que en la gónada puede observarse tejido de ambos sexos, las especies gonocoristas indiferenciadas se llaman a veces falsos hermafroditas, falsos porque no cambian de sexo cuando son adultos y sólo producen gametos de un tipo durante toda su vida. A veces también se les llama hermafroditas juveniles (Maak *et al.*, 2003). Este segundo término puede llevar a confusión, por lo que no se debería usar, de la misma manera que no se deberían llamar protogíneas.

El proceso morfológico de la diferenciación sexual en una especie gonocorista diferenciada se ilustra tomando el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) como ejemplo (Fig. 6).

La morfología de las gónadas de los teleósteos en un contexto filogenético ha sido revisada por Parenti y Grier (2004). Serían convenientes más trabajos como este porque hace demasiado tiempo que hay conceptos que se van repitiendo sin actualizarse. Es plausible que la gran diversidad morfológica de los peces se manifieste también en la estructura de sus gónadas. Con el incremento del número de especies examinadas no es pues extraño que aparezcan «excepciones» a lo que se considera regla, que de hecho no hace sino reflejar el aún limitado conocimiento que se tiene de aspectos básicos. Ejemplos de ello son la espermatogénesis semicística del lenguado (García-López *et al.*, 2005), los patrones «atípicos» de proliferación de células germinales de *Siganus guttatus* (Komatsu *et al.*, 2006) o el gradiente cefalocaudal y la

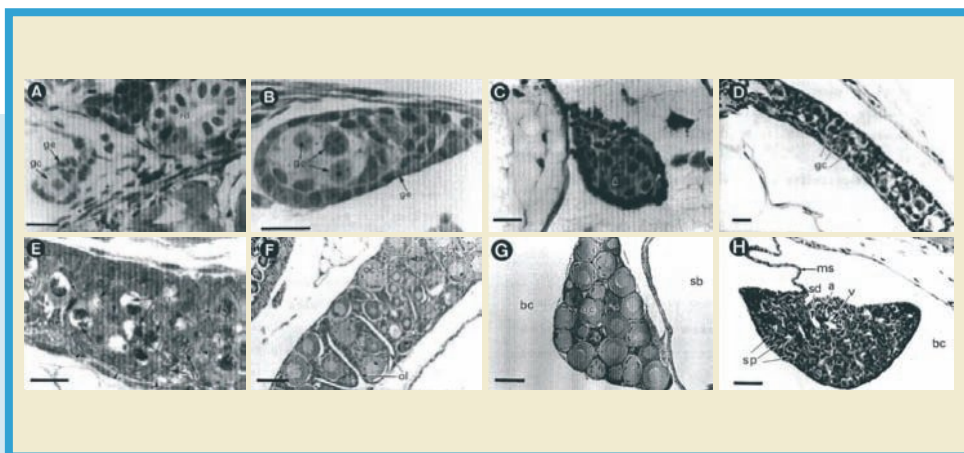


FIGURA 6.

Fotomicrografías del desarrollo gonadal y la diferenciación sexual del salmón del Pacífico (*Oncorhynchus kisutch*). **A)** Sección transversal de la gónada indiferenciada 1 día antes de la eclosión. La cresta genital se acaba de formar. **B)** Sección transversal de la gónada indiferenciada 6 días tras la eclosión (dph). El número de células de la cresta germinal ha aumentado y puede observarse la configuración del tejido somático en estroma y epitelio germinal. **C)** Sección transversal de la gónada indiferenciada 20 dph. El número de células germinales ha aumentado por mitosis y el órgano posee una forma característica de pera. Algunas células (flecha) están a punto de entrar en meiosis. **D)** Sección longitudinal de la gónada indiferenciada 20 dph. La gónada es un filamento de unas 40 μm de grosor. **E)** Sección longitudinal de una gónada 27 dph comenzando la diferenciación sexual hacia hembra. Pueden observarse células germinales en la profase de la primera división meiótica (leptoteno, paquiteno temprano y paquiteno tardío). Obsérvese la diferencia en la apariencia de la cromatina según la fase de desarrollo. El grosor de la gónada es de unas 60 μm . **F)** Sección longitudinal del ovario de una hembra 76 dph. Se pueden observar varios oocitos primarios de distinto tamaño en el estadio perinucleolar temprano, así como la formación de lamelas ováricas. Algunos oocitos contienen cuerpos de Balbiani rodeando al núcleo. **G)** Sección transversal de un ovario 104 dph. Obsérvese la forma triangular y el desarrollo sincrónico de los oocitos. Algunos cuerpos de Balbiani aún pueden distinguirse en algunos oocitos. **H)** sección transversal de un testículo 130 dph lleno de espermatogonias y con el sistema vascular desarrollado. Abreviaciones: a, arteria gonadal; bb, cuerpo de Balbiani; bc = cavidad visceral; gc = gonocito; ge, epitelio germinal; lt, leptoteno; ms, mesorquio; nc, nucleolo; oc, oocito primario; ol, lamela ovárica; pc, paquiteno; rd, mesonefros; sb, vejiga natatoria; sd, espermiducto; sp, espermatogonia; st, estroma; v, vena gonadal; zge, zigoteno temprano; zgl, zigoteno tardío; La escala de magnificación representa 20 μm en A-E; 100 μm en F y G, y 40 μm en H. Tomado de Piferrer (1990).



asimetría en el desarrollo de las gónadas del pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Strüssmann y Ito, 2005). Además, cambios morfológicos de la gónada durante la diferenciación sexual particulares según la cepa considerada han sido identificados en el pez cebra (Maak *et al.* 2003).

4.4.2.4. Intersexos

Un elemento recurrente en la diferenciación sexual de los peces es la aparición de intersexos en especies que normalmente son gonocoristas. Estos animales se caracterizan por poseer gónadas con tejido ovárico y testicular o la presencia de unas pocas células germinales de un sexo dentro de una gónada del sexo contrario (normalmente oocitos dentro de un testículo). La incidencia de la intersexualidad fue ampliamente revisada por Atz (1964). En especies como la lubina, en la que su diferenciación sexual se conoce bien, se ha observado la presencia de oocitos intratesticulares («ovo-testis») en juveniles acabados de diferenciar sexualmente (Saillant *et al.*, 2003b). Se desconoce si ello es reflejo de la masculinización de hembras genotípicas debida a la alta temperatura del agua empleada en las hatcheries (Piferrer *et al.*, 2005), si es reflejo de la inestabilidad propia originada por tener un sistema de determinación sexual polifactorial (Vandeputte *et al.*, 2007) o por una combinación de varios factores.

Los intersexos pueden aparecer también en los peces como consecuencia de la exposición a contaminantes químicos presentes en el medio acuático. Estos contaminantes reciben el nombre de disruptores endocrinos (EDC en sus siglas en inglés) si son capaces de alterar de alguna forma el normal desarrollo y/o funcionamiento del sistema endocrino de los animales. Actualmente, una vez descubierta su existencia, hay una importante actividad investigadora en relación a su detección, efectos biológicos y consecuencia para los ecosistemas, aspectos que no serán tratados aquí. Simplemente añadir que el proceso de diferenciación sexual de los peces, sujeto a una regulación hormonal concreta, por su naturaleza lábil es un efecto biológico muy interesante para el estudio de los efectos de los disruptores endocrinos. Por ejemplo, carpas expuestas a contaminantes de origen antropogénico muestran una serie de alteraciones morfológicas y fisiológicas en las que se incluye la presencia de intersexos (Solé *et al.*, 2003). Recientemente, el



efecto de los disruptores endocrinos y su efecto particular sobre la aromatasa ha sido ampliamente revisado por Cheshenko *et al.* (2008).

4.4.3. Control endocrino de la diferenciación sexual

Al contrario de lo que acontece con la determinación sexual, los genes implicados en la regulación de la diferenciación sexual están razonablemente bien conservados en todos los vertebrados y, por supuesto, dentro e los propios peces (Place y Lance, 2004). Sin embargo, sigue existiendo la suficiente variabilidad como para que observaciones hechas en una determinada especie no sean necesariamente extrapolables a otra, incluso dentro de las de un mismo tipo de reproducción. El proceso de la diferenciación sexual ha sido revisado con anterioridad por diferentes autores (Nakamura *et al.*, 1998; Baroiller *et al.*, 1999; Piferrer, 2001; Strüssmann y Nakamura, 2002; Devlin y Nagahama, 2002; Nagahama, 2005; Nakamura *et al.*, 2005).

Avances importantes en la comprensión de la diferenciación sexual han sido posibles gracias a poder estudiar los cambios de los elementos reguladores de este proceso antes de que se manifieste el efecto de sus acciones, de forma que se pueda separar causa de efecto. Ello es posible mediante la creación de lotes de peces de sólo un sexo (monosexo) en los que su sexo genotípico es conocido (por ejemplo, mediante la creación de genotipos XX, XY e YY por cruces deliberados) ya en el momento de la fertilización. Comparando cambios observados durante la diferenciación sexual entre los distintos genotipos es luego posible relacionar fenotipo con genotipo. Para aquellas especies en las que no se puedan generar estos genotipos porque su mecanismo de determinación sexual no lo permite, existen estrategias como las basadas en la diferenciación sexual dependiente del crecimiento y explicadas en la sección 4.3.5.

4.4.3.1. Esteroides sexuales

En todos los vertebrados, los esteroides sexuales son uno de los productos o el producto de secreción más importantes de las gónadas si se atiende a la concentración que pueden alcanzar en el plasma (Borg, 1994). Los esteroides sexuales comprenden a los progestágenos, andrógenos y estrógenos. Los más importantes para la diferencia-



ción sexual son los dos últimos tipos mencionados. Su implicación en el citado proceso fue demostrado hace tiempo (Yamamoto, 1969), de forma que la aplicación de andrógenos resulta en la masculinización de una gónada indiferenciada, mientras que la de estrógenos en su feminización, independiente de su sexo genotípico.

Los esteroides sexuales se sintetizan a partir del colesterol, el cual es trasladado al interior de la mitocondria de las células esteroidogénicas gracias a la ayuda de una proteína transportadora llamada StAR (Arakane *et al.* 1997). La ruta sintética desde el colesterol hasta los andrógenos y estrógenos se muestra en la Figura 7 y las enzimas que los sintetizan reciben el nombre de enzimas esteroidogénicas. Bogart (1987) propuso que la diferenciación sexual mediada por esteroides sexuales dependía de la abundancia relativa entre andrógenos y estrógenos. Como se puede observar, dicha proporción relativa depende casi en exclusiva de la enzima citocromo P450 aromatasa, producto del gen *cyp19a* y abreviado de distintas formas en la bibliografía (aromatasa, P450arom, *cyp19a*, *cyp19a1*). Más tarde, se demostró que la actividad de esta enzima era esencial para la diferenciación sexual de las hembras (Piferrer *et al.*, 1994a; Guiguen *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 2000, 2002; Kitano *et al.*, 2000; D'Cotta *et al.*, 2001b; Nagahama, 2005); Además, mientras que en los mamíferos el andrógeno principal es la testosterona (T), en los peces son los andrógenos con grupos oxígeno en el carbono 11 tales como la 11-cetotestosterona (11-KT), 11 β -hidroxandrostenediona y 11 β -hidroxitestosterona (11 β -hidroxi-T), los más importantes para el desarrollo de los machos (Piferrer *et al.*, 1993; Baroiller *et al.*, 1999).

4.4.3.2. Enzimas esteroidogénicas

Como se ha visto en la sección anterior, los esteroides sexuales son sintetizados por enzimas esteroidogénicas. Al contrario de lo que ocurre con otras muchas hormonas, los esteroides sexuales no se almacenan tras su síntesis sino que son liberados inmediatamente para ejercer sus acciones auto-, para- o endocrinas. Debido a esta propiedad, se toman los cambios en la expresión de los genes que codifican los citados enzimas o la medida de su actividad catalítica como indicadores de la síntesis de esteroides que acontece en cada momento. Las principales

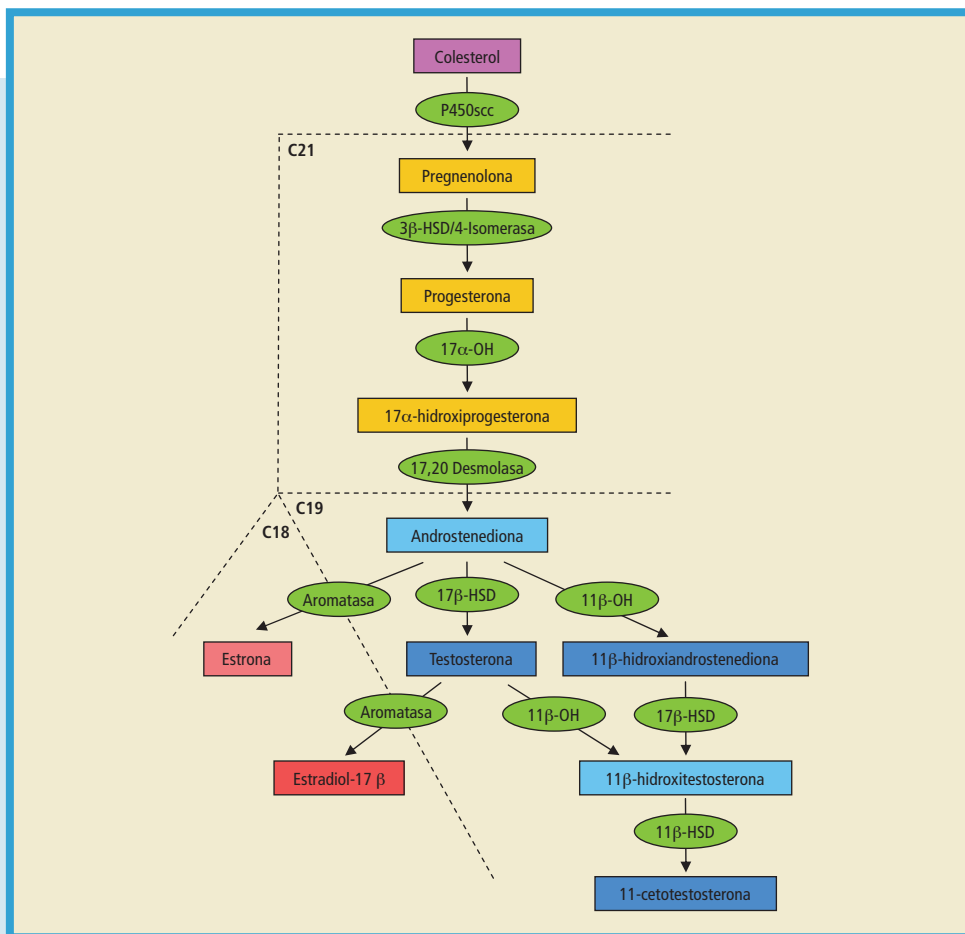


FIGURA 7.

Ruta esteroidogénica (simplificada) desde el colesterol hasta los principales esteroides sexuales. Las elipses verdes representan las principales enzimas esteroidogénicas. Los progestágenos, esteroides sexuales de 21 átomos de carbono (C21) se representan en amarillo, los andrógenos (C19) en azul y los estrógenos (C18) en rojo. Diferencias en la saturación del color indican diferencias en potencia relativa de andrógenos y estrógenos estimulando la diferenciación sexual hacia machos y hembras, respectivamente, sin pretender ser proporcional. Obsérvese que la abundancia relativa entre andrógenos y estrógenos depende fundamentalmente de la actividad aromatasa. Abreviaciones: P540scc, citocromo P450 de escisión de la cadena lateral; 3β-HSD/4-isomerasa, 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/4-isomerasa; 17α-OH, 17α-hidroxilasa; 17β-HSD, 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa; 11β-OH, 11β-hidroxilasa; 11β-HSD, 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa.



enzimas esteroidogénicas implicadas en la síntesis de los esteroides sexuales se muestran en la figura 7.

4.4.3.2.1. Aromatasa

La presencia de algunas enzimas esteroidogénicas como P450_{scc} y P450_{c17}, ya sea porque se detecta la proteína por inmunocitoquímica, la localización el mRNA mediante hibridación in situ (ISH) o su cantidad mediante PCR cuantitativa, indica la producción de esteroides sexuales (Morrey *et al.*, 1998; Miura *et al.*, 2008). Sin embargo, la presencia de P450_{11β}, y especialmente CYP19 (aromatasa) es indicativa de producción de andrógenos y estrógenos, respectivamente, hormonas importantes para la diferenciación sexual en peces. Como se ha visto anteriormente, la aromatasa determina la proporción relativa de andrógenos y estrógenos durante la esteroidogénesis.

Los peces tienen dos isoformas de la aromatasa, producto de dos genes distintos. La isoforma gonadal está codificada por el gen *cyp19a* y la otra isoforma, llamada cerebral o neuronal, está codificada por el gen *cyp19b* (e.g., Trant *et al.*, 2001; Callard *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2005; Dalla Valle *et al.*, 2002; Piferrer y Blázquez, 2005). La estructura genómica de la isoforma gonadal puede observarse en la figura 8A. La aromatasa es una proteína de unos 505-520 aa localizada en el retículo endoplasmático de las células esteroidogénicas, particularmente las de granulosa en el folículo ovárico. La síntesis de estrógenos –estradiol-17β (E₂) y estrona (E₁)– a partir de andrógenos –testosterona (T) y androstenediona (Δ⁴), respectivamente– implica la formación de metabolitos intermediarios. Este proceso aparece ilustrado en la figura 8B.

En la aromatasa de peces, típicamente la constante de Michaelis-Menten (K_m), que indica la afinidad del enzima por el sustrato, se sitúa en el rango nanomolar, y aunque la actividad catalítica máxima (V_{máx}) puede ser considerable, niveles del orden de 1 pmol/mg proteína/hora proporcionan unos niveles de estrógeno fisiológicamente suficientes para las necesidades del animal (González y Piferrer, 2002; 2003).

La aromatasa importante para la diferenciación sexual es la isoforma gonadal (Guiguen *et al.*, 2009). Así, incremento de los niveles de su mRNA preceden o coinciden con la diferenciación sexual femenina en un variado número de especies (Guiguen *et al.*, 1999; Chang *et*

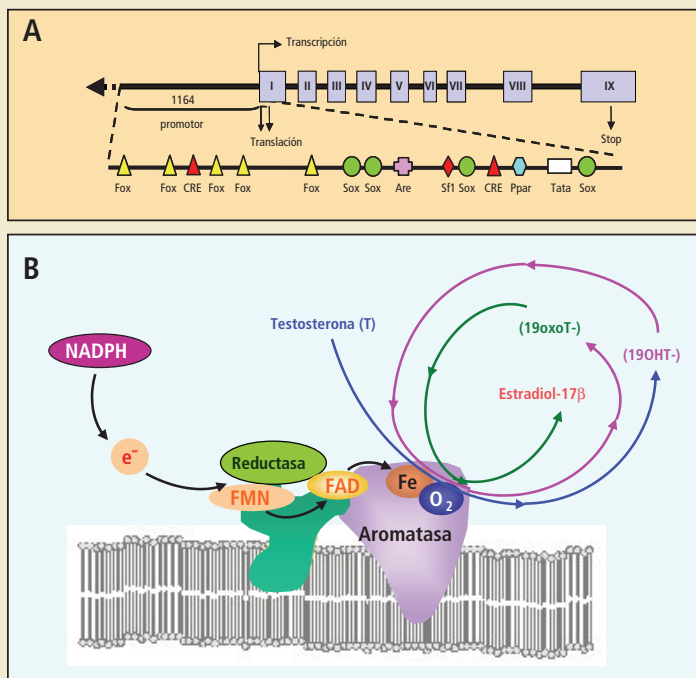


FIGURA 8.

La enzima esteroidogénica citocromo P450 aromatasa. **A)** Estructura genómica del gen *cyp19a* de la isoforma gonadal de la aromatasa en peces teleosteos. En la región codificadora se indican los exones I-IX y en la región promotor se indican los lugares de unión de varios factores de transcripción según su abreviación convencional. Abreviaciones: ARE, elemento de respuesta a andrógenos; CRE, elemento de respuesta a cAMP; Fox, elemento de respuesta a factores de transcripción Fox (forkhead); PPAR, elementos de respuesta a la proliferación de peroxisomas; SF-1, elementos de respuesta a SF-1; Sox, elementos de respuesta a factores de transcripción Sox; TATA, caja TATA. Según datos de Dalla Valle et al. (2002) para la región codificadora y de Galay-Burgos et al. (2006) para el promotor de *cyp19a* de lubina (*Dicentrarchus labrax*). **B)** Diagrama del anclaje del complejo citocromo P450 aromatasa y NADPH-citocromo P450 óxido-reductasa a la membrana del retículo endoplasmático. Se indican los grupos prostéticos: Flavín adenina dinucleótido (FAD) de la aromatasa y Flavín mononucleótido (FMN) de la reductasa, los electrones (e^-) procedentes de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) reducida, así como el hierro (Fe) y el oxígeno molecular (O_2) en el sitio de unión de la P450 aromatasa. Los metabolitos intermedios de la testosterona (T), 19OHT- y 19oxoT- se representan entre paréntesis. Según González (2003).



al., 1999; Kitano *et al.*, 2000; Trant *et al.*; 2001; Kwon *et al.*, 2000; Sudhakumari *et al.*, 2005; van Nes *et al.*, 2005; Matsuoka *et al.*; 2006; Blázquez *et al.*, 2008, 2009), lo que indica que esta función es importante y está conservada probablemente en todos los teleósteos.

La isoforma cerebral controla la disponibilidad de estrógeno en el cerebro durante etapas sensibles del desarrollo (Kishida y Callard, 2001; Callard *et al.*, 2001; Kwon *et al.*, 2000; Trant *et al.*, 2001; Blázquez y Piferrer, 2004; Menuet *et al.*, 2002; Jeng *et al.*, 2005; Sudhakumari *et al.*, 2005; Strobl-Mazzulla *et al.*, 2005). El cerebro de los peces hermafroditas integra la información ambiental (Francis, 1992). Sin embargo, aún no existe información suficiente que demuestre que la isoforma cerebral está implicada en la diferenciación sexual de las gónadas de peces gonocoristas (Blázquez *et al.*, 2008).

La inhibición de la aromatasa gonadal durante el periodo de diferenciación sexual provoca que hembras genotípicas se desarrollen como machos fenotípicos, lo que indica la importancia del estrógeno para el desarrollo ovárico de los peces (Piferrer *et al.*, 1994a; Guiguen *et al.*, 1999; Kwon *et al.* 2000; Kitano *et al.*, 2000; Fenske y Segner, 2004; Bhandari *et al.*, 2006; Guiguen *et al.*, 2009). Asimismo, se ha observado que temperaturas altas son capaces de inhibir la expresión de la aromatasa (D'Cotta *et al.*, 2001a; Karube *et al.*, 2007; van Nes y Andersen, 2006), lo que provoca una masculinización de hembras genotípicas similar a la obtenida con la administración de andrógenos, por lo que en algunos casos ya se está estudiando la aplicación de altas temperaturas para la producción de lotes monosexo (ver sección 4.5.1.3).

La aromatasa es importante también para el cambio de sexo de los hermafroditas (Nakamura *et al.*, 2005), incrementando los niveles de su mRNA durante el cambio de sexo protándrico (macho → hembra) (Kroon *et al.* 2005) y disminuyéndolos con el cambio proterogíneo (hembra → macho) (Bhandari *et al.* 2003; 2004; Nakamura *et al.*, 2006).

Debido a su posición central en la diferenciación ovárica, es posible usar los niveles de la expresión de *cyp19a* como marcador para determinar el sexo de peces sexualmente indiferenciados (Vizziano *et al.*, 2007; Luckenbach *et al.*, 2005; Matsuoka *et al.*, 2006). En la lubina, las gónadas no se diferencian hasta que los animales llegan a los 8 cm de longitud estándar, pero a los 5 cm ya se pueden separar los anima-



les en dos grupos: uno con niveles basales de expresión de aromatasa (futuros machos) y otros con niveles superiores a los registrados en animales de menos de 5 cm en longitud (futuras hembras) (Blázquez, *et al.* 2009). Ello requiere sacrificar a algunos animales para determinar la proporción de sexos de un lote, pero vale la pena si ello contribuye a tomar decisiones en relación a rendimiento de los cultivos y planes de selección.

La región promotora del gen de la aromatasa está recibiendo actualmente la atención que merece (Tanaka *et al.* 1995; Khul *et al.* 2005; Callard *et al.* 2001; Tchoudakova *et al.* 2001; Kazeto *et al.* 2001; Kazeto y Trant 2005; Tong *et al.* 2003; Chang *et al.* 2005; Wong *et al.*, 2006; Galay-Burgos *et al.* 2006), puesto que es muy importante conocer cómo se regula la expresión de esta enzima (Piferrer y Blázquez, 2005). La distribución de las dos isoformas de la aromatasa, la regulación transcripcional y la modulación de esta enzima por medio de disruptores endocrinos ha sido revisado recientemente por Cheshenko *et al.* (2008). Asimismo, otras formas de regulación de la aromatasa, caracterizadas por cambios muy rápidos en la actividad enzimática y presentes en algunos tejidos relacionados con la reproducción, pero no descritas aún en peces, han sido discutidas por su posible implicación durante la diferenciación sexual (Piferrer y Blázquez, 2005).

4.4.3.2.2. 11 β -hidroxilasa

Se puede considerar que tras la aromatasa el citocromo P450 11 β -hidroxilasa (11 β -OH), codificado por el gen *cyp11b*, es la enzima esteroidogénica más importante. 11 β -OH convierte androstenediona (Δ^4) y T en 11 β -hidroxi- Δ^4 , 11 β -hidroxi-T y 11-KT, que son potentes andrógenos en peces (Piferrer *et al.*, 1993; Baroiller *et al.*, 1999). Por lo tanto, no es de extrañar que un incremento de su expresión se asocie a la diferenciación testicular de la trucha (Liu *et al.*, 2000), lubina (Socorro *et al.*, 2007; Blázquez *et al.*, 2009) y tilapia del Nilo (D'Cotta *et al.*, 2001b).

4.4.3.3. Receptores de esteroides sexuales

Los receptores de esteroides sexuales son factores de transcripción que actúan tras la unión a sus ligandos correspondientes. En relación a la diferenciación sexual, son de interés el receptor de andrógeno



(AR) y el de estrógeno (ER). La poca información disponible sobre ARs concierne a un par de especies hermafroditas, donde se demostró que los niveles de mRNA de AR eran más altos en la fase transitoria y de macho que en la de hembra, sugiriendo que los andrógenos son importantes para la función testicular (Kim *et al.*, 2002; He *et al.*, 2003). La misma información no está disponible para especies gonocoristas, aunque en la lubina niveles altos de AR podían estar relacionados con la maduración precoz de los machos más que con la diferenciación sexual propiamente dicha (Blázquez y Piferrer, 2005). Hasta recientemente no se ha encontrado un receptor regulado por 11-KT, pero no el propio receptor de 11-KT (Olsson *et al.*, 2005). Una posibilidad es que dicho receptor no existiera como tal y que los altos niveles de 11-KT registrados en plasma durante la reproducción sirviesen para desplazar T de la proteína transportadora de esteroides, SHBG (Miguel-Queralt *et al.*, 2007), liberándola y poniéndola a disposición de su propio receptor (G. Hammond, com. pers.).

Los peces poseen tres receptores de estrógeno (ER) llamados ER α , ER β 1 y ER β 2 (o ER α , ER β y ER γ en algunos casos) producto de duplicación génica (Hawkins *et al.*, 2000), con distinta secuencia nucleotídica, distribución tisular, regulación y una alta afinidad por los ligandos, especialmente E₂, etinilestradiol-17 α (EE₂) y dietilstilbestrol (DES) (Barrero-Gil *et al.*, 2004). Algunos estudios han examinado su expresión durante el desarrollo temprano (Halm *et al.*, 2004; Sudhakumari *et al.*, 2005; Kawamura *et al.*, 2003), y su implicación en el proceso de diferenciación sexual es esperable, aunque las evidencias directas no existen todavía.

Una visión sinóptica de los genes implicados en la regulación de la diferenciación sexual se encuentra en la figura 9. Independientemente de que la determinación sexual sea genotípica o ambiental, una de las primeras diferencias entre sexos durante la diferenciación sexual es una distinta dinámica en lo que concierne a la proliferación de células germinales. Así, mientras que en las hembras las mencionadas células empiezan inmediatamente su proliferación, la acción de un gen master determinante del sexo como DMY en los machos –caso de que la determinación fuese genotípica– serviría para temporalmente prevenir la proliferación de las células germinales, lo que de alguna forma con-

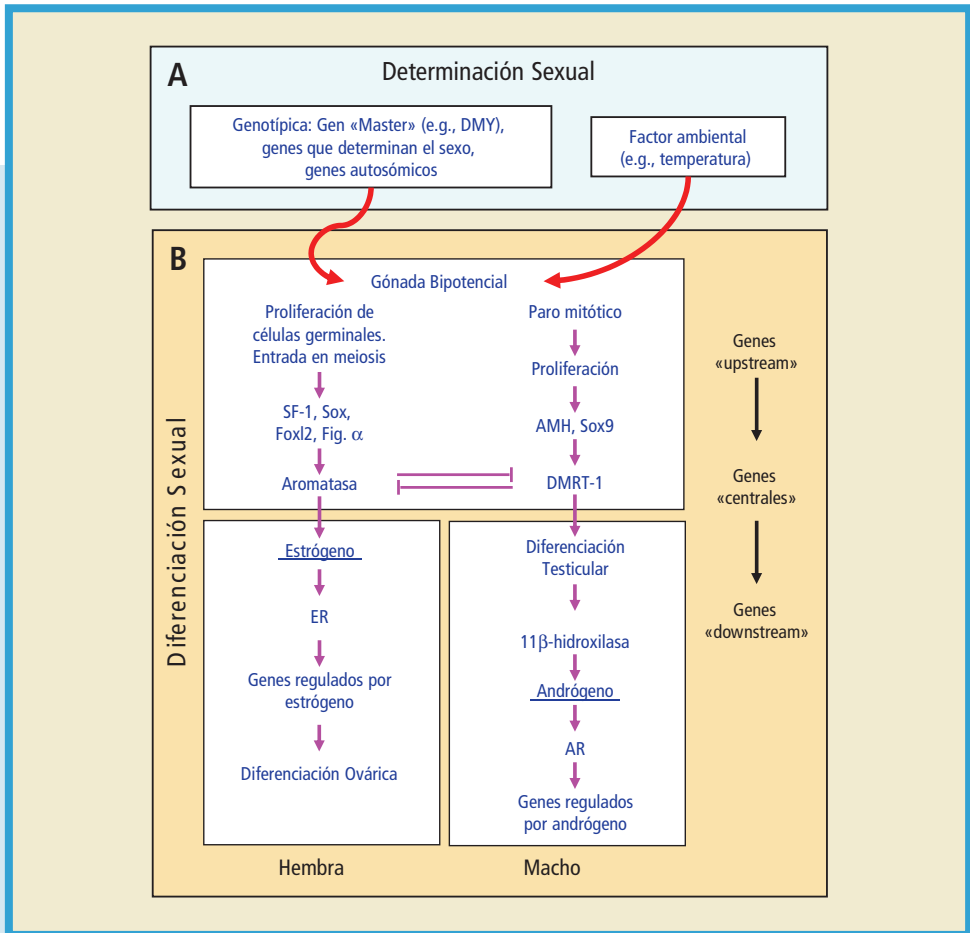


FIGURA 9.

Diagrama de la diferenciación sexual mostrando las rutas de señalización implicadas, comenzando por la determinación sexual (A), ya sea genotípica o ambiental, la cual actuando sobre una gónada bipotencial provoca su diferenciación sexual (B). Esta figura no representa a ninguna especie en particular, sino que pretende ser un compendio de lo que actualmente se conoce. *DMRT-1* podría estar situado por encima de aromatasa. En cualquier caso, aromatasa y *DMRT-1* ocupan una posición central en la diferenciación de los peces, y su función parece estar conservada en muchas especies, pudiendo contraponerse mutuamente (indicado por los símbolos $\longleftrightarrow$). En hembras el estrógeno es esencial para el desarrollo ovárico, mientras que en los machos los andrógenos parecen ser un producto de la diferenciación testicular. Las flechas verticales hacia abajo sólo indican el flujo de los eventos, sin denotar causalidad. Modificado de Piferrer y Guiguen (2008).



duciría a su diferenciación posterior en espermatogonias y el desarrollo de la diferenciación testicular. En cualquier caso, parece previsible que los estudios encaminados a esclarecer la comunicación entre células somáticas y germinales durante estas fases críticas van a aportar conocimientos muy interesantes.

4.4.3.4. Otros reguladores de la diferenciación sexual

Actualmente, existen un buen número de factores de transcripción y de crecimiento que están siendo estudiados por su posible implicación en la diferenciación sexual de los vertebrados. Los factores de transcripción que han recibido mayor atención hasta la fecha son aquellos relacionados con el control de la expresión de aromatasa al ser esta enzima una posición preeminente en el proceso de diferenciación sexual. Una lista de los factores citados con un resumen de su relación (fuerte o débil) con la diferenciación sexual se encuentra en la Tabla 5. Una descripción pormenorizada de su relación con dicho proceso puede encontrarse en Piferrer y Guiguen (2008).

Según la información de la que se dispone actualmente, parece ser que los genes implicados en la diferenciación sexual están razonablemente bien conservados entre todos los vertebrados. Sin embargo, es posible que algunas funciones estén reguladas por genes específicos en cada grupo o que algunos de los componentes citados hayan sido incorporados por evolución convergente. Además, debido a las sucesivas duplicaciones genómicas que periódicamente han sufrido los peces a lo largo de su evolución, se han dado subfuncionalizaciones tras esas duplicaciones, lo que sin duda ofrece nuevas posibilidades al animal que posee la nueva variante y plantea retos al investigador que intenta descubrir la función de estos genes.

Las nuevas tecnologías genómicas serán de gran ayuda en este campo de investigación (e.g., Wen *et al.*, 2005). La secuenciación de insertos de gran tamaño (p. ej. genotecas de BACs) será útil en el aislamiento de genes determinantes del sexo o ligados al sexo. Por otro lado, el análisis transcriptómico gracias al empleo de microarrays contribuirá si duda al descubrimiento de patrones de expresión génica asociados a un determinado proceso o como respuesta a ciertas condiciones ambientales, lo que contribuirá a una mejor comprensión de



TABLA 5.

Factores de transcripción, de crecimiento y otros elementos con diferentes grados de evidencia respecto a su implicación en la diferenciación sexual de los peces

Elemento	Acciones	Referencias
Factores de transcripción		
DMRT-1	Involucrado en la diferenciación testicular. Muy conservado en el reino animal. Posible inhibidor de aromatasa	Marchand <i>et al.</i> (2000); Deloffre <i>et al.</i> (2009)
Sox	Amplia familia de factores de transcripción involucrados en la organogénesis. Sox24 en ovario de trucha; Sox17 en ovario de lubina; Sox9 en testículo de medaka	Galay-Burgos <i>et al.</i> (2004); Nakamoto <i>et al.</i> (2005); Kanda <i>et al.</i> (1998); Navarro-Martín <i>et al.</i> (2009a)
SF-1 /Ad4BP / FTZ-F1	Regula la transcripción de enzimas esteroideogénicas Estimula la transcripción de aromatasa	Yoshiura <i>et al.</i> (2003); Kobayashi <i>et al.</i> (2005)
DAX-1	Represor transcripcional involucrado en la diferenciación ovárica Inicialmente considerado un represor del desarrollo testicular.	Wang <i>et al.</i> (2002)
Foxl2	Uno de los marcadores de diferenciación ovárica mas tempranos Estimula transcripción de la aromatasa	Wang <i>et al.</i> (2007); Yamaguchi <i>et al.</i> (2007)
WT-1	Formación del sistema urogenital Efectos aún no bien definidos en la diferenciación sexual	Lee y Kocher (2007)
Factores de crecimiento		
AMH	Inhibe la formación del conducto de Müller Mayor expresión en testículo que en ovario	Yoshinaga <i>et al.</i> (2004); Halm <i>et al.</i> (2007)
FGF	Antagonista de Wnt4 Estimula expresión de Sox9. Implicado en la proliferación de células de Sertoli	Kim <i>et al.</i> (2006)
IFG-1	Potente agente mitogénico Implicado en proliferación celular y posiblemente en entrada en meiosis	Berishvili <i>et al.</i> (2006)
Otros elementos		
SHBG	Transporta esteroides sexuales Posible función en la diferenciación sexual desconocida	Baron <i>et al.</i> (2005); Miguel-Queralt <i>et al.</i> (2007)
SCP3	Marcador meiótico Posible uso como marcador de diferenciación ovárica	Kluver <i>et al.</i> (2007)
Figα	Marcador de células germinales Usado para monitorizar el desarrollo de oocitos	Kanamori <i>et al.</i> (2006)
Vasa	Marcador de células germinales	Viñas y Piferrer (2008)



la determinación y diferenciación sexual en los peces y permitirá establecer que cambios han sufrido los factores implicados. Una discusión sobre las perspectivas para la aplicación de estas nuevas tecnologías genómicas en el estudio de la diferenciación sexual en los peces puede encontrarse en Piferrer y Guiguen (2008).

4.4.4. Cerebro y diferenciación sexual.

Control neuroendocrino

Si bien hay información que sugiere que en los peces el cerebro integra los estímulos ambientales que desencadenan en la gónada el cambio de sexo (Francis, 1992), en los gonocoristas, en cambio, esta información es muy escasa todavía. Es decir, no se tiene una idea clara de si el proceso de diferenciación sexual de las gónadas es autónomo, genéticamente programado o si, por el contrario, tiene lugar bajo la estimulación directa del cerebro. Por tanto, mientras está bien establecido que existe el eje cerebro-hipófisis-gónada controlando el ciclo reproductor de los peces, actualmente aún no se puede hablar de dicho eje en lo que concierne al proceso de diferenciación sexual. Recientemente, Moles *et al.* (2005) mostraron que en la lubina el cerebro puede tener dicha función a través de secreciones de FSH hipofisaria tras la correspondiente estimulación por parte de las hormonas liberadoras de las gonadotrofinas (GnRHs), particularmente en su variante sbGnRH, que mostró unos patrones de expresión sexo-dependientes. Estudios futuros que incluyan la medida de FSH y LH en sangre así como la expresión de sus receptores en las gónadas serán de incalculable ayuda para comprender la posible función del cerebro en la diferenciación sexual de las especies gonocoristas.

4.5. APLICACIONES A LA ACUICULTURA Y GESTIÓN DE RECURSOS

Conocer la determinación y diferenciación sexual de los peces no sólo tiene interés académico sino que es muy importante para la gestión de reproductores y el desarrollo de métodos de control de la reproducción en acuicultura. Asimismo, es importante para comprender cómo se establece la proporción de poblaciones naturales sujetas a



cambios ambientales y a presión antropogénica mediante las pesquerías, especialmente en el contexto de cambio climático. Recientemente, se ha sugerido explotar el conocimiento de los sistemas de determinación sexual para el control de poblaciones naturales. A continuación se explican brevemente las aplicaciones en acuicultura y al control de poblaciones. La aplicación de las técnicas de control de sexo para más de 50 especies importantes en la acuicultura de varios países fue revisada por Piferrer (2001). Además, las posibilidades para sus aplicaciones concretas a las especies importante para la acuicultura española han sido recientemente discutidas (Piferrer, 2007). Aquí, por tanto, se da sólo una visión muy superficial del tema.

4.5.1. Aplicaciones a la acuicultura y a la acuarofilia

La existencia de un dimorfismo sexual en cuanto al crecimiento y edad de primera maduración sexual es bastante común en los peces (Parker, 1992; Imsland *et al.*, 1997; Saillant *et al.*, 2001). Ello trae como consecuencia que la proporción de sexos influya en la distribución de tallas en una población, así como a su dinámica de crecimiento. Por lo tanto, es normal que en acuicultura se desee cultivar sólo el sexo de mayor crecimiento, para maximizar la producción, o bien aquel sexo que no madure sexualmente en plena fase de engorde, para evitar los problemas que ello comporta. Es por esta razón que se cultivan poblaciones monosexo en acuicultura (Donaldson y Hunter, 1982; Cherfas *et al.*, 1996; Beardmore *et al.*, 2001; Piferrer, 2001). El control del sexo se aplica también para un mejor aprovechamiento de las consecuencias de inducción a la triploidía, que son más severas en las hembras (Benfey, 1999; Piferrer *et al.*, 2009). La producción de lotes monosexo tiene también interés en el cultivo de peces ornamentales para acuarofilia, puesto que en estos peces, que son normalmente especies tropicales de agua dulce, existe un marcado dimorfismo sexual, normalmente en forma de vistosos caracteres sexuales secundarios en los machos. En función de la presencia más o menos acusada de estos caracteres, el precio de venta de un macho puede ser varias veces superior al de una hembra, tal y como ocurre, por ejemplo, en muchos Poecílidos. Las perspectivas y primeros intentos del control del sexo en peces ornamentales fue discutida por Piferrer y Lim (1997).



4.5.1.1. Problemática en hatcheries y durante la fase de engorde

En las hatcheries, la proporción de sexos de los reproductores es muy importante para obtener las puestas en número y volumen deseadas. Un aumento del número de huevos obtenidos se puede conseguir con un aumento de la proporción de las hembras en los reproductores de una instalación, lo que permite un aumento de la producción de alevines o juveniles. De la misma forma, con un aumento de la proporción de las hembras se puede obtener el mismo número de huevos aún reduciendo el número total de reproductores, lo que en este caso permite reducir el coste de mantenimiento de los mismos. Por tanto, en los peces de cultivo es muy conveniente poder controlar la proporción de sexos en las hatcheries porque puede conllevar importantes ventajas de cara a aumentar su rentabilidad (Piferrer, 2007).

Por otro lado, la fase de engorde es muy importante para el rendimiento de los cultivos debido a su duración dentro del ciclo de producción así como por la cantidad de recursos que se invierten en forma de instalaciones, personal y alimento (Rizzo y Spagnolo, 1996). Es concretamente en esta fase cuando aparecen problemas derivados de dimorfismo sexual en crecimiento y maduración sexual (Zanuy *et al.*, 2001). Aquí el control de la proporción de sexos permite el cultivo sólo de hembras, que en promedio crecen sobre un 30% más que los machos en muchas especies, por lo que es fácil deducir las ventajas que supone poder disponer de lotes monosexo. Además, con lotes de un solo sexo se reduce significativamente la dispersión de tallas y la consiguiente necesidad de separar a los animales en grupos con tallas más uniformes para aprovechar mejor el alimento.

En resumen, el control de la proporción de sexos de los peces es una opción muy interesante en acuicultura. Prueba de ello es que se aplica de forma rutinaria en el cultivo comercial de varias especies (Hulata, 2001), principalmente de salmónidos. En estas especies se desarrollaron en buena medida las técnicas de control de sexo en peces, gracias a poseer un mecanismo de determinación sexual que facilitó tal desarrollo. Así, el cultivo de poblaciones formadas sólo por hembras se lleva a cabo en Europa en la producción de trucha arco iris, trucha común



y salvelino (Piferrer *et al.*, 2009), así como en otros países del mundo, como Canadá, en donde se aplica al cultivo del salmón del Pacífico (Solar y Donaldson, 1991), y en Japón, en donde se aplica al cultivo del fletán de aquel país (Yamamoto, 1999).

4.5.1.2. Métodos para el control de la proporción de sexos

El control de la proporción de sexos en acuicultura puede conseguirse mediante varias aproximaciones. La más comúnmente utilizada es el control endocrino o hormonal del sexo, mediante feminización directa o indirecta (Beardmore *et al.*, 2001; Piferrer, 2001). Otras aproximaciones consisten en la inducción a la triploidía, de hecho para producir animales estériles y así evitar los efectos negativos de la maduración sexual (Benfey, 1999; Felip *et al.*, 2001; Piferrer *et al.*, 2009), y la masculinización de hembras ginogénicas en especies de determinismo sexual XX/XY (Piferrer *et al.*, 2007).

En algunos casos se puede explotar los mecanismos de determinación sexual para crear lotes monosexo mediante el cruzamiento de especies próximas. Este es, por ejemplo, el caso de los híbridos entre el rodaballo, *Scophthalmus maximus*, y el rémol (llamado también rombo o coruxo), *S. rhombus*. Los híbridos³ fruto de un cruce de rodaballo x rémol siempre son hembras, mientras que los de rémol x rodaballo siempre son machos. Por lo tanto, el sexo del híbrido corresponde con el sexo del rodaballo utilizado en los cruces, lo que sugiere que los factores determinantes del sexo del rodaballo son capaces de imponerse a los del rémol.

En otros casos es posible también explotar la creación de genotipos especiales, por ejemplo los llamados «supermachos» para crear lotes monosexo (Beardmore *et al.*, 2001).

Sin embargo, los métodos más comunes para el control de la proporción de sexos en peces son los hormonales. Ello se basa en el hecho de que, como se ha visto en la sección 4.4.3.1, la diferenciación sexual en los peces es muy dependiente de los esteroides sexuales («masculinos»: andrógenos y «femeninos»: estrógenos), de tal forma que,

³ Siguiendo la convención para la descripción de híbridos, siempre la primera especie parental que se nombra es la hembra.



en general, los andrógenos masculinizan y los estrógenos feminizan cuando actúan sobre una gónada sexualmente indiferenciada y son aplicados en lo que se conoce como el periodo lábil (Piferrer, 2001). En la lubina, por ejemplo, este periodo comprende aproximadamente desde los 90 a los 120 días tras la fertilización (Blázquez *et al.*, 2001). Es en esta propiedad en la que se basa la terapia endocrina o tratamiento hormonal para conseguir el sexo deseado. Así, un macho genotípico sin tratar da lugar a un macho fenotípico, lo mismo que se obtiene si se trata con andrógeno. Sin embargo, el tratamiento con andrógeno puede resultar en la esterilización hormonal (Piferrer *et al.*, 1994b) si la combinación de dosis y duración del tratamiento es superior a la requerida para la masculinización. El tratamiento de un macho genotípico con estrógeno da lugar a una hembra fenotípica (Blázquez *et al.*, 1998b). Todo ello asumiendo que las dosis, tiempo de aplicación y otras variables han sido tenidas en cuenta. Por el contrario, normalmente una hembra genotípica da lugar a una hembra fenotípica. El tratamiento de una hembra genotípica con andrógeno (Baron *et al.*, 2008), un inhibidor de la aromatasa (Piferrer *et al.*, 1994a) o alta temperatura (Uchida *et al.*, 2004) da como resultado un macho fenotípico. Por lo tanto, por razones biológicas hay más posibilidades para masculinizar que para feminizar, a pesar de que la feminización es normalmente la estrategia preferida.

Dentro del control endocrino del sexo, la feminización directa consiste en la administración de estrógenos en lotes de peces indiferenciados. Este procedimiento está permitido por la legislación vigente en muchos países puesto que en él se usan tratamientos relativamente cortos con el estrógeno natural estradiol-17 β durante las primeras fases del desarrollo a bajas dosis (<10 mg/kg pienso). Los metabolitos resultantes se eliminan completamente en cuestión de unas pocas semanas (Piferrer y Donaldson, 1994), haciendo los peces tratados perfectamente aptos para el consumo. Sin embargo, la feminización directa no es aconsejable según el criterio del sector productivo, que no le interesa mezclar su producto con este tipo de tratamientos, por lo que a la práctica este método no se emplea, al menos en países desarrollados.

Por el contrario, el método indirecto, que funciona mejor si el mecanismo de determinación sexual es del tipo XXXY, consiste en el uso



de esperma obtenido de hembras genéticas (XX) producidas por tratamiento con andrógenos (llamados «neomachos») para la fertilización de huevos normales, siempre portadores del cromosoma X. (Fig. 10). Puesto que este método es tedioso, como alternativa se empieza en algunos casos con la masculinización de hembras genéticas obtenidas por ginogénesis tal y como se ha apuntado anteriormente (Piferrer *et al.*, 2007). En cualquier caso, con el método indirecto se obtienen lotes todo hembras que jamás han sido expuestos a tratamiento alguno con esteroides (Piferrer, 2001). Este método está siendo empleado en producción en algunas especies, fundamentalmente de salmónidos, por tener un sistema de determinación sexual compatible con su aplicación (Piferrer *et al.*, 2009).

El principal inconveniente del método indirecto, a parte del tiempo que requiere su implantación, es la necesidad de separar

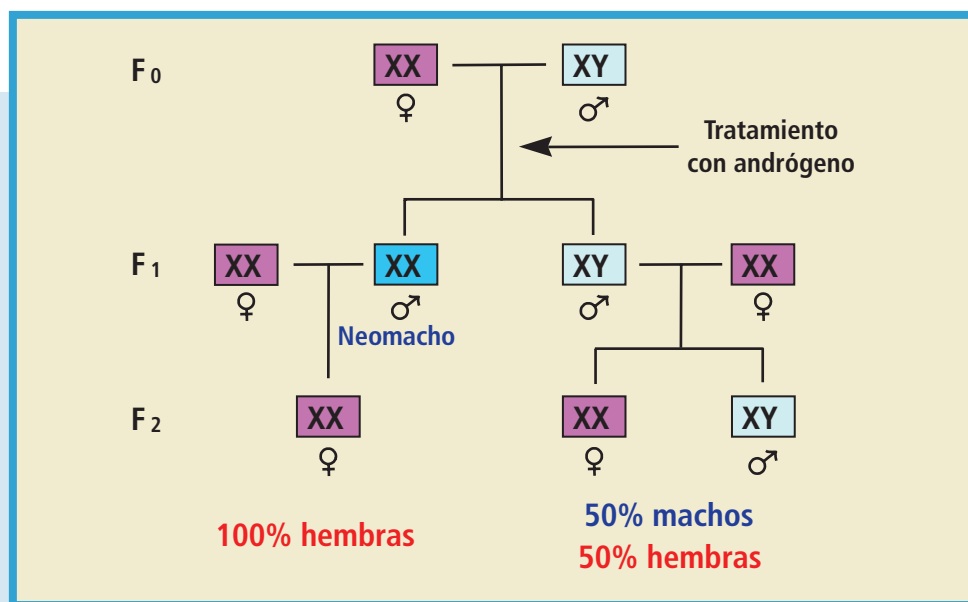


FIGURA 10.

Método de feminización hormonal indirecta mediante tratamiento con andrógeno, aplicable a especies en las que las hembras son el sexo homogamético (XX). Los neomachos (XX) pueden distinguirse de los machos genotípicos (XY) mediante una prueba de progenie o con el empleo de sondas moleculares. Modificado de Piferrer (2001).



a los machos normales de los neomachos. Para ello es necesaria una prueba de progenie que requiere de cruzamientos deliberados, aislamiento de familias y análisis de la proporción de sexos de la progenie. Ello se puede obviar ya en algunos casos gracias al desarrollo de sondas moleculares basadas en secuencias ligadas al sexo (Brunelli y Thorgaard, 2004). Éstas permiten identificar el sexo genotípico mediante el análisis del ADN genómico obtenido de un fragmento de tejido (p. ejemplo, de una escama o aleta), por lo que no es necesario el sacrificio del animal. Algunos de estos métodos basados en sondas moleculares ya se usan comercialmente (Devlin *et al.*, 1994).

Para la producción de lotes formados solo por machos puede usarse un método indirecto parecido, consistente en el tratamiento con estrógeno tanto si en una especie el sexo homogamético son las hembras (Piferrer, 2001) o los machos (George y Pandian (1995).

4.5.1.3. Control térmico de la diferenciación sexual

Como se ha visto en la sección 4.4.3.2.1, la exposición a temperaturas altas durante las fases larvarias y postlarvarias de los peces resulta en muchos casos en una inhibición de la aromatas y la consiguiente masculinización de hembras genotípicas, que se desarrollan como machos fenotípicos. Estas altas temperaturas usadas en producción durante la etapa de hatchery son las responsables de las altas proporciones de machos que se observan normalmente en el cultivo de algunas especies tales como la lubina, en donde de promedio son del 75%, alcanzando a veces la totalidad de los animales. Se sospecha que este efecto es también generalizado en otros casos como, por ejemplo, en el lenguado del Senegal, *Solea senegalensis*, aunque la incidencia de machos en los cultivos de esta especie aún no ha sido determinado con suficiente precisión.

El uso de altas temperaturas es negativa porque si bien sirve para acelerar la fase de hatchery y así poder transferir a los animales cuanto antes a las jaulas para su engorde, resulta en la citada masculinización y, como se ha visto, los machos generalmente crecen menos que las hembras. Recientemente, se ha desarrollado un método en el que jugando con los tiempos durante los cuales se aplican temperaturas



bajas para luego pasar a más altas, se consigue por un lado evitar la masculinización indeseada y por otro mantener las ventajas del crecimiento rápido producto de las altas temperaturas (Navarro-Martín *et al.*, 2009b).

4.5.1.4. Aplicaciones a especies importantes en acuicultura

Una lista de tratamientos hormonales eficaces para el control del sexo en más de 50 especies de peces de varias familias distintas puede encontrarse en Piferrer (2001), así como unas indicaciones para el desarrollo de estas técnicas nuevas especies. El estado actual del conocimiento de los mecanismos de determinación y diferenciación sexual así como de los métodos para su control en algunas especies importantes para la acuicultura española se ha discutido con más detalle en Piferrer (2007) y aquí se reproduce de forma resumida en la Tabla 6.

TABLA 6.

Determinación sexual, diferenciación sexual y control de la proporción de sexos para las especies más importantes para la piscicultura mediterránea (tomado de Piferrer, 2007).

Especie	Determinación sexual	Diferenciación sexual	Control de la proporción de sexos
Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	Desconocida	Hermafrodita proterándrico (Zohar <i>et al.</i> , 1978)	Feminización directa (Condeça y Canario, 2001)
Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Propuesta como del tipo polifactorial con fuerte influencia ambiental (Vandeputte <i>et al.</i> , 2007)	Gonocorista tipo diferenciado (Piferrer <i>et al.</i> , 2005)	Feminización directa (Blázquez <i>et al.</i> , 1998b)
Rodaballo (<i>Scophthalmus maximus</i>)	Cromosómica monofactorial tipo XX/XY según datos de ginogénesis (Cal <i>et al.</i> , 2006a). Otros datos sugieren un sistema ZW/ZZ	Gonocorista tipo diferenciado (Piferrer <i>et al.</i> , datos no publicados)	Feminización directa (Piferrer <i>et al.</i> , datos no publicados), aumento de proporción de hembras en los triploides (Cal <i>et al.</i> , 2006b), feminización indirecta (Piferrer <i>et al.</i> , datos no publicados) y a través de ginogénesis (Cal <i>et al.</i> , 2006a)
Corvina (<i>Argyrosomus regius</i>)	Desconocida	Gonocorista tipo aún desconocido	No disponible
Anguila (<i>Anguilla anguilla</i>)	Cromosómica monofactorial tipo ZW/ZZ (Passakas, 1981).	Gonocorista tipo indiferenciado (Colombo y Grandi, 1996)	Feminización directa (Colombo y Grandi, 1995)
Besugo (<i>Pagellus bogaraveo</i>)	Desconocida	Hermafrodita simultáneo (Krug, 1990)	No disponible
Lenguado (<i>Solea senegalensis</i>)	Probablemente cromosómica monofactorial tipo XX/XY, aunque <i>S. solea</i> parece tener el sistema ZW/ZZ (Howell <i>et al.</i> , 1995)	Gonocorista tipo diferenciado (Viñas <i>et al.</i> , datos no publicados)	Feminización directa e indirecta (Asensio <i>et al.</i> , datos no publicados) y probablemente por ginogénesis (Navas <i>et al.</i> , com. pers.)
Abadejo (<i>Pollachius pollachius</i>)	Desconocida	Gonocorista tipo aún desconocido	No disponible



4.5.1.5. Percepción social

Como se ha indicado más arriba, el método directo de control de la proporción de sexos es perfectamente legal en muchos países, puesto que varias investigaciones han demostrado que las dosis necesarias son muy bajas, que los residuos se eliminan en cuestión de unas tres semanas tras la finalización del tratamiento y que, si se tiene en cuenta que dicho tratamiento tiene lugar al principio del desarrollo, ello significa que los animales no son sacrificados para su consumo hasta pasados típicamente unos 20 meses o más tras el fin del tratamiento (Piferrer y Donaldson, 1994). Sin embargo, hay una percepción social negativa al uso de esteroides sexuales en animales destinados al consumo, percepción que frecuentemente responde más a una reacción emocional que no racional al tema. Es por esta razón que los métodos directos no tienen futuro al menos en países desarrollados, donde la conciencia social en temas de seguridad alimentaria es muy alta.

En contra, es previsible que con un mejor conocimiento de los mecanismos de determinación de sexo y el desarrollo de sondas moleculares permita, por un lado, comprender mejor las claves de la regulación de la determinación y diferenciación sexual y, por otro, acortar los tiempos de implantación de terapias hormonales por el método indirecto en el que los animales que van destinados al consumo jamás han sido tratados con hormonas.

4.5.2. Gestión de poblaciones naturales y control de especies invasoras

Recientemente, se ha propuesto un método basado en la manipulación de los mecanismos de determinación y diferenciación sexual para el control y eventual extinción de poblaciones de especies ícticas invasoras o bien simplemente para el control de las poblaciones de ciertas especies muy prolíficas (Gutiérrez y Teem, 2006). El método se basa en introducir hembras portadoras de dos cromosomas Y (YY) en la población a extinguir. El cruce de estos animales -cuyos cromosomas YY han sido bautizados como cromosomas sexuales troyanos- con machos salvajes resulta en una progenie de 100% machos (XY e YY). Se ha calculado que con la introducción de un número de hembras YY que represente el 3% de



la población diana, se va generando una desproporcionada cantidad de machos y la consiguiente desaparición de las hembras hasta el colapso de la población. La generación de genotipos YY («supermachos») ya se había ensayado con anterioridad (Devlin y Nagahama, 2002) con motivo de estudios encaminados a esclarecer el mecanismo de determinación sexual de algunas especies. Sin embargo, el método que ahora nos ocupa representa un paso más al feminizar estos supermachos.

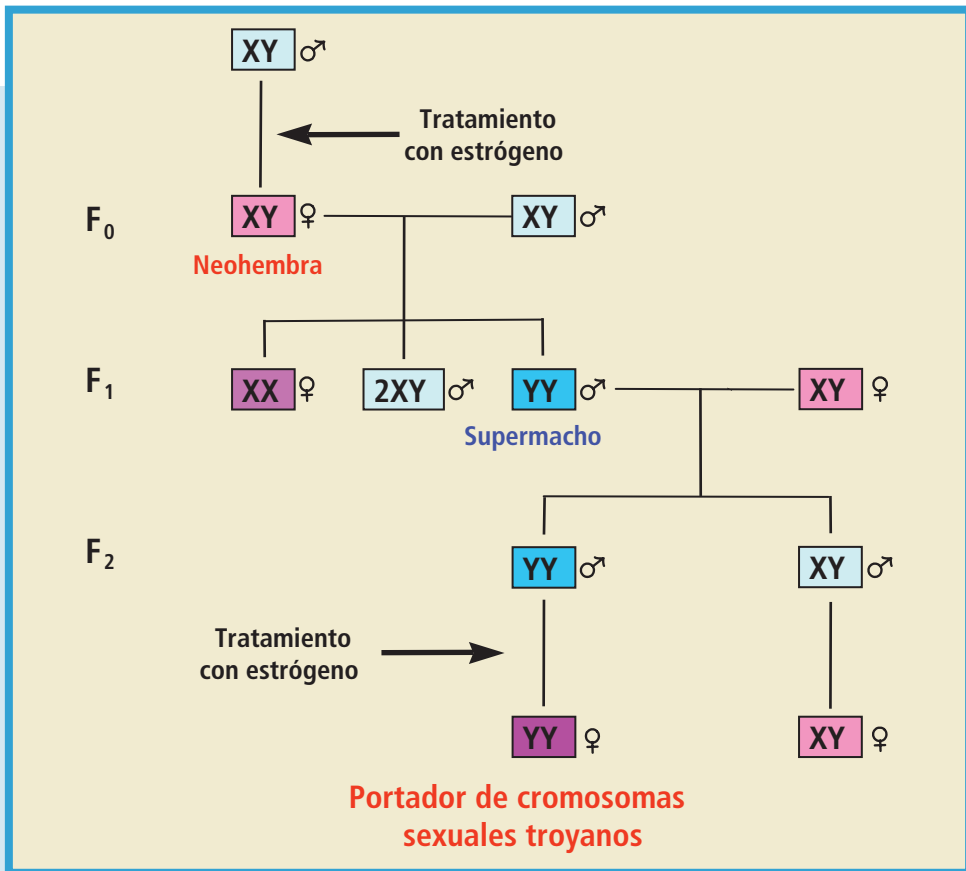


FIGURA 11.

Producción de individuos portadores de cromosomas sexuales troyanos para el control de poblaciones en el medio natural mediante la generación de hembras YY por tratamiento con estrógeno de machos normales (XY) y de supermachos (YY).

Adaptado de Cotton y Wedekind (2007a).



Para la creación de hembras con cromosomas troyanos, en primer lugar machos genotípicos (XY) se feminizan con estrógeno (Fig. 11). Las hembras XY resultantes cruzan con machos normales (XY), lo que da una progenie en la que un 25% de los animales son machos YY. Éstos se pueden distinguir de machos normales mediante el uso de sondas asociadas al cromosoma Y o bien por una prueba de progenie, puesto que estos machos dan una progenie 100% macho (XY) cuando se cruzan con hembras normales (XX). La obtención de hembras YY puede conseguirse con varias combinaciones, una de ellas se muestra en la Fig. 11. En teoría este método puede aplicarse no sólo a especies con sistemas XX/XY sino que, con ligeras modificaciones, a especies con pocos factores determinantes del sexo en cromosomas sexuales e incluso con loci secundarios en los autosomas (Cotton y Wedekind, 2007a). La aplicación en una situación real y los frutos de la misma están aún por comprobar.

Con un cambio en los tratamientos hormonales, el mismo principio puede usarse para el fin opuesto, es decir, para aumentar las poblaciones en peligro o en vías de extinción. Puesto que la capacidad reproductora de las poblaciones está muy influida por el número de hembras, en este caso se trata de aplicar la metodología de cromosomas troyanos para aumentar progresivamente el número de hembras de la población (Cotton y Wedekind, 2007b).

4.6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

4.6.1. Tipos de reproducción

Respecto a la presencia y distribución de los tres tipos de reproducción presentes en los peces, gonocorismo, hermafroditismo y unisexualidad, y dejando a un lado el primero de ellos como tipo mayoritario y más estudiado, parece razonable esperar que en los próximos años se producirán avances significativos en el conocimiento probablemente en los tipos menos estudiados. Si contemplamos el pasado inmediato observamos el descubrimiento de los hermafroditas secuenciales bi-direccionales y la publicación de un estudio afirmando la presencia de partenogénesis facultativa en una especie de tiburón. A pesar de los numerosos estudios sobre el hermafroditismo en peces, el citado



tipo había pasado desapercibido. En el catálogo de los tipos de reproducción de los elasmobranquios sólo aparecía el gonocorismo, y si el hermafroditismo bidireccional no se esperaba en los teleósteos, menos aún lo era la unisexualidad en los elasmobranquios. Este tipo de reproducción puede ser una auténtica caja de Pandora, no sólo porque ahora se va viendo que hay un mayor número de especies unisexuales de las que pensaba sino porque poco a poco se van comprendiendo mejor los mecanismos genéticos que las generan o que las mantienen. Estos son sólo casos que ilustran lo que pueden deparar los años venideros y recuerdan que en biología –y lo que concierne a la reproducción de los peces puede ser un buen ejemplo– no se puede dar casi nada por imposible, y que el dogmatismo no es buen compañero de poyata.

4.6.2. Determinación sexual

Con el descubrimiento en el 2002 del primer gen determinante del sexo en peces, *DMY*, y el primero distinto al *Sry* de los mamíferos, empezó una carrera para encontrar genes ortólogos en otras especies, carrera que duró muy poco al descubrirse que *DMY* lo poseían sólo un par de especies del género *Oryzias* muy próximas, mientras que otras igualmente próximas no lo poseían. Ello indicaba que los genes situados en lo más alto de la cascada reguladora de la determinación sexual eran muy variados y que podrían esperarse muchos de ellos en peces. Darse cuenta de esto no ha sido en vano, pues de momento aunque no hay otros genes determinantes del sexo identificados hasta ahora, al menos sí que muchas regiones relacionadas con la determinación del sexo en especies importantes para la acuicultura han sido identificadas. Por clonación posicional tarde o temprano se dará con los correspondientes genes, especialmente si se han originado sobre la base de mutaciones por translocación. Todo ello permitirá conocer en mayor profundidad el grado de variabilidad en mecanismos de determinación del sexo que existe en peces, servirá para comprender su evolución y quizá resolverá una de las grandes paradojas de la biología del desarrollo que estos genes presentan: si la reproducción sexual es tan importante para la especie y la determinación del sexo constituye una función biológica esencial, ¿cómo es posible entonces que, al contrario de lo que ocurre con todas las demás funciones biológicas de



importancia similar, los genes determinantes del sexo sean tan poco conservados?

La determinación del sexo en especies hermafroditas prácticamente no ha sido abordada ni siquiera conceptualmente. El proceso en sí de cambio de sexo no sólo empieza a estar razonablemente bien explicado a nivel morfológico, sino también a nivel bioquímico y molecular. Sin embargo, aparte del tipo de consideraciones propias de la teoría de asignación de sexos de Charnov (ver sección 4.1.1), para las cuales hay un *corpus* importante de información, brillan por su ausencia planteamientos tales como qué tipo de mecanismo de determinación sexual pueden poseer las especies hermafroditas, excepto por tímidos intentos de agrupar el hermafroditismo y el gonocorismo bajo un mismo paraguas conceptual (Oldfield, 2005). Por ejemplo, parece poderse descartar un mecanismo de determinación sexual de tipo polifactorial (ver sección 4.3.2.3), al menos en la gran mayoría de casos, puesto que si lo fuera, en una misma especie podría haber individuos proterándricos y proterogíneos, dependiendo de qué combinación de genes determinantes del sexo se heredasen, y este fenómeno no se ha descrito. La excepción podría encontrarse en algunos góbidos tropicales (e.g., género *Trimma*), hermafroditas bidireccionales, si investigaciones más detalladas determinasen que el primer sexo funcional de algunos individuos es el masculino mientras que en el otro es el femenino. Un sistema monofactorial con factores principales puede descartarse por razones obvias. La aplicación de los conocimientos sobre genética molecular acumulados en los últimos años en estudios con especies gonocoristas debería dar buenos frutos en especies diándricas y digíneas.

4.6.3. Diferenciación sexual

La diferenciación sexual empieza a estar razonablemente bien conocida a nivel morfológico e incluso bioquímico y molecular porque, al contrario de lo que sucede con la determinación sexual, los genes implicados están más conservados, por lo que los descubrimientos en una especie son fácilmente exportables a otras especies. Los genes implicados el proceso empiezan a conocerse, aunque sin duda hay muchos aún por descubrir. Aquí la transcriptómica puede ser de gran ayuda. El uso de los microarrays para el estudio de la expresión de



un elevado número de genes puede ser también útil en el estudio de relaciones fisiológicas complejas tales como la correlación entre el crecimiento y la reproducción.

Previsiblemente la enzima aromatasa conservará su posición preeminente en las investigaciones (Guiguen *et al.*, 2009). En este sentido es muy importante comprender con mayor detalle los mecanismos moleculares de su regulación, incluyendo tanto a las rutas de señalización convencionales como a las no convencionales (Piferrer y Blázquez, 2005), así como entender los efectos morfogénicos de los estrógenos en las gónadas de los peces.

Identificar el o los mecanismos moleculares mediante los cuales el ambiente ejerce su influencia es fundamental, tanto para las especies con TSD como para las especies con GSD + EE. Aquí se aventura que los mecanismos epigenéticos se revelaran como muy importantes, concretamente la modificación de la expresión génica por metilación de secuencias de DNA en las regiones reguladoras de genes clave. En este sentido el reciente descubrimiento de diferencias entre sexos en el grado de metilación del promotor de la aromatasa gonadal de la lubina (Navarro-Martín *et al.*, 2007) apunta directamente en esta dirección, lo que significa la incorporación de los estudios de epigenética a la reproducción de los peces.

4.6.4. Aplicación a la acuicultura y a la gestión de recursos

La identificación de genes determinantes del sexo o ligados al sexo en las especies de mayor interés en acuicultura es requisito esencial para desarrollar métodos de identificación del sexo genotípico basados en sondas o marcadores moleculares. Éstos se pueden aplicar para la selección de los reproductores o para la selección temprana del sexo en especies donde un sexo en particular tiene un interés comercial específico. El reciente desarrollo de mapas genéticos en las especies más importantes para la acuicultura marina española: lubina (Chistiakov *et al.*, 2005), dorada (Franch *et al.*, 2006) y rodaballo (Bouza *et al.*, 2007), representa un paso importante en esta dirección, ya que facilitará la identificación de loci de caracteres cuantitativos (QTL) relacionados con el sexo genético que eventualmente contribuirá al aislamiento y caracterización molecular del gen o genes responsables de la determi-



nación sexual en estas especies. Esto permitiría el desarrollo de pruebas basadas en análisis de DNA genómico que serán muy útiles en los programas de selección de rasgos particulares de interés y en la gestión de los reproductores, ya que no implican el sacrificio del animal. Ello contribuirá a la mejora de las prácticas de la acuicultura y por lo tanto de la producción. Por ejemplo, puede ayudar a comprender mejor el efecto de las condiciones de cultivo sobre la proporción de sexos, no sólo en lo referente a variables físicas como la temperatura, sino también a biológicas, e.g., relación crecimiento-diferenciación sexual. Los mapas de ligamiento pueden utilizarse para la identificación de QTL que sean más adelante útiles para la selección de peces de un sexo en particular, es decir, aquel que exhibe tasa de crecimiento más rápido, la maduración retrasada, o la calidad del producto superior.

Actualmente, existe una presión considerable para maximizar el rendimiento de los cultivos debido la cada vez mayor industrialización y competitividad del sector, reflejo de la expansión a escala mundial de la acuicultura, tanto en volumen de producción como en número de especies cultivadas. Es por este motivo que existe un deseo por conocer los mecanismos de determinación y diferenciación sexual de los peces para poderlos controlar como opción para un creciente número de especies.

BIBLIOGRAFÍA

- ABUCAY, J. S., G. C. MAIR, D. O. F. SKIBINSKI y J. A. BEARDMORE, 1999 Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 173: 219-234.
- AIDA, T., 1921 On the inheritance of color in a fresh-water fish *Aplocheilus latipes* Temminck & Schlegel, with special reference to sex-linked inheritance. *Genetics* 6: 554-573.
- ALMEIDA-TOLEDO, L. F. y F. FORESTI, 2001 Morphologically differentiated sex chromosomes in neotropical freshwater fish. *Genetica* 111: 91-100.
- ALVES, M.J., M.M. COELHO, y M.J. COLLARES-PEREIRA, 2001. Evolution in action through hybridisation and polyploidy in an Iberian freshwater fish: A genetic review. *Genetica* 111: 375-385.
- ARAKANE, F., S.R. KING, Y. DU, C.B. KALLEN, L.P. WALSH, H. WATARI, D.M. STOCO y J.F. STRAUSS III, 1997 Phosphorylation of steroidogenic acute regulatory pro-



- tein (StAR) modulates its steroidogenic activity. *J. Biol. Chem.* 272: 32656-32662.
- ATZ, J. W., 1964 Intersexuality in fishes, pp. 145-232 en *Intersexuality in Vertebrates Including Man*, editado por C. N. Armstrong y A. J. Marshall. Academic Press, London.
- BAROILLER, J. F. y H. D'COTTA, 2001 Environment and sex determination in farmed fish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 130: 399-409.
- BAROILLER, J. F., Y. GUIGUEN y A. FOSTIER, 1999 Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 910-931.
- BARON, D., R. HOULGATTE, A. FOSTIER y Y. GUIGUEN, 2005 Large-scale temporal gene expression profiling during gonadal differentiation and early gametogenesis in rainbow trout. *Biol. Reprod.* 73: 959-966.
- BARON, D., J. MONTFORT, R. HOULGATTE, A. FOSTIER y Y. GUIGUEN, 2007 Androgen-induced masculinization in rainbow trout results in a marked dysregulation of early gonadal gene expression profiles. *BMC Genomics* 8: 357.
- BARRERO-GIL, J., P. THOMAS y F. PIFERRER, 2004 Estrogen binding sites in the ovary of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Fish Phys. Biochem.* 28: 369-370.
- BEARDMORE, J. A., G. C. MAIR y R. I. LEWIS, 2001 Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. *Aquaculture* 197: 283-301.
- BENFEY, T.J., 1999 The physiology and behavior of triploid fishes. *Rev. Fish. Sci.* 7: 39-67.
- BERISHVILI G., H. D'COTTA, J.F. BAROILLER, H. SEGNER y M. REINECKE, 2006 Differential expression of IGF-I mRNA and peptide in the male and female gonad during early development of a bony fish, the tilapia *Oreochromis niloticus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 146: 204-210.
- BHANDARI R. K., H. KOMURO, S. NAKAMURA, M. HIGA y M. NAKAMURA, 2003 Gonadal restructuring and correlative steroid hormone profiles during natural sex change in protogynous honeycomb grouper, *Epinephelus merra*. *Zool. Sci.* 20:1399-1404.
- BHANDARI, R. K., M. HIGA, S. NAKAMURA y M. NAKAMURA, 2004 Aromatase inhibitor induces complete sex change in a protogynous honeycomb grouper, *Epinephelus merra*. *Mol. Reprod. Dev.* 67: 303-307.
- BHANDARI, R. K., M. NAKAMURA, T. KOBAYASHI y Y. NAGAHAMA, 2006 Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 145: 20-24.
- BLÁZQUEZ, M. y F. PIFERRER, 2004 Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mol. Cell. Endocrinol.* 219: 83-94.



- BLÁZQUEZ, M. y F. PIFERRER, 2005 Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) androgen receptor: cDNA cloning, tissue-specific expression and mRNA levels during early development and sex differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 237: 37-48.
- BLÁZQUEZ, M., S. ZANUY, M. CARRILLO y F. PIFERRER, 1998a Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Exp. Zool.* 281: 207-216.
- BLÁZQUEZ, M., S. ZANUY, M. CARRILLO y F. PIFERRER, 1998b Structural and functional effects of early exposure to estradiol-17 β and 17 α -ethynylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost *Dicentrarchus labrax*. *Fish Physiol. Biochem.* 18: 37-47.
- BLÁZQUEZ, M., M. CARRILLO, S. ZANUY y F. PIFERRER, 1999 Sex ratios in offspring of sex-reversed sea bass and the relationship between growth and phenotypic sex differentiation. *J. Fish Biol.* 55: 916-930.
- BLÁZQUEZ, M., A. FELIP, S. ZANUY, M. CARRILLO y F. PIFERRER, 2001 Critical period of androgen-inducible differentiation in a teleost fish, the European sea bass. *J. Fish Biol.* 58: 342-358.
- BLÁZQUEZ, M. A. GONZÁLEZ, M. PAPADAKI, C. MYLONAS, y F. PIFERRER, 2008. Sex-related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 158: 95-101.
- BLÁZQUEZ, M., L. NAVARRO-MARTÍN y F. PIFERRER, 2009. Expression profiles of sex differentiation-related genes during ontogenesis in the European sea bass acclimated to two different temperatures. *J. Exp. Zool.* 312 B (en prensa).
- BOGART, M. H., 1987 Sex determination: A hypothesis based on steroid ratios. *J. Theor. Biol.* 128: 349-357.
- BORG, B., 1994 Androgens in teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol. C* 109: 219-245.
- BOUZA, C., L. SÁNCHEZ, y P. MARTÍNEZ, 1994 Karyotype characterization of turbot (*Scophthalmus maximus*) with conventional, fluorochrome and restriction endonuclease-banding techniques. *Mar. Biol.* 120: 609-613.
- BOUZA, C., M. HERMIDA, B. G. PARDO, C. FERNÁNDEZ, G.G. FORTES, J. CASTRO, L. SÁNCHEZ, P. PRESA, M. PÉREZ, A. SANJUÁN, A. DE CARLOS, J. A. ÁLVAREZ-DIOS, S. EZCURRA, R. M. CAL, F. PIFERRER y P. MARTÍNEZ, 2007. A microsatellite genetic map of the turbot (*Scophthalmus maximus*). *Genetics* 177: 2457-2467.
- BREder C. M. y D. E. ROSEN, 1966 Modes of reproduction in fishes. Natural History Press. Garden City, New York.
- BRUNELLI, J. P. y G. H. THORGAARD, 2004 A new Y-chromosome-specific marker for Pacific salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* 133: 1247-1253.
- BULL, J.J., 1983 Evolution of sex determining mechanisms. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park.



- CAL, R. M., S. VIDAL, P. MARTÍNEZ, B. ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, C. GÓMEZ y F. PIFERRER, 2006a Growth and gonadal development of gynogenetic diploid turbot (*Scophthalmus maximus*). J. Fish Biol. 67: 1-13.
- CAL, R. M., S. VIDAL, C. GÓMEZ, B. ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, P. MARTÍNEZ y F. PIFERRER. 2006b. Growth and gonadal development in diploid and triploid turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 251: 99-108.
- CALLARD, G. V., A. V. TCHOUDAKOVA, M. KISHIDA y E. WOOD, 2001 Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 79: 305-314.
- CAMPOS-RAMOS, R., S. C. HARVEY, J. S. MASABANDA, L. A. P. CARRASCO, D. K. GRIFFIN, B. J. McANDREW, N. R. BROMAGE y D. J. PENMAN, 2001 Identification of putative sex chromosomes in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*, through synaptonemal complex and FISH analysis. Genetica 111: 143-153.
- CARRASCO, L. A. P., D. J. PENMAN y N. R. BROMAGE, 1999 Evidence for the presence of sex chromosomes in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from synaptonemal complex analysis of XX, XY and YY genotypes. Aquaculture 173: 207-218.
- CHANG, C.F., C. Y. HUNG, M. C. CHIANG y S. C. LAN, 1999 The concentrations of plasma sex steroids and gonadal aromatase during controlled sex differentiation in grey mullet, *Mugil cephalus*. Aquaculture 177: 37-45.
- CHANG, X., T. KOBAYASHI, B. SENTHILKUMARAN, H. KOBAYASHI-KAJURA, C. C. SUDHAKUMARI y Y. NAGAHAMA, 2005 Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Gen. Comp. Endocrinol. 141: 101-115.
- CHARNOV, E.L., 1982 The Theory of Sex Allocation. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 355 pp.
- CHARNOV, E.L. y J.J. BULL, 1977 When is sex environmentally determined? Nature 266: 828-830.
- CHERFAS, N. B., B. GOMELSKY, N. BEN-DOM, D. JOSEPH, S. COHEN, I. ISRAEL, M. KABESSA, G. ZOHAR, Y. PERETZ, D. MIREZ y G. HULATA, 1996 Assessment of all-female common carp progenies for fish culture. Isr. J. Aquacult. 48: 149-157.
- CHESHENKO, K., F. PAKDEL, H. SEGNER, O. KAH y R. I. L. EGGEN, 2008 Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction in teleost fish. Gen. Comp. Endocrinol. 155, 31-62.
- CHISTIAKOV, D. A., B. HELLEMANS, C. S. HALEY, A. S. LAW, C. S. TSIQENPOULUS, G. KOToulas, D. BERTOTTO, A. LIBERTINI y F. A. M. VOLCKAERT, 2005 A microsatellite linkage map of the European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. Genetics 170: 1821-1826.



- CHOUDHURY, R. C., R. PRASAD, D. C. CHARAN, 1982 Karyological studies in five tetraodontiform fishes from the Indian ocean. *Copeia* 1982: 728-732.
- CNAANI, A., B. Y. LEE, N. ZILBERMAN, C. OZOUF-COSTAZ, G. HULATA, M. RON, A. D'HONT, J.F. BAROILLER, H. D'COTTA, D. J. PENMAN, E. TOMASINO, J. P. COUTANCEAU, E. PEPEY, A. SHIRAK y T. D. KOCHER, 2008 Genetics of sex determination in tilapia species. *Sex. Dev.* 2:43-54.
- COLOMBO, G. y G. GRANDI, 1995 Sex differentiation in the European eel: histological analysis of the effects of sex steroids on the gonad. *J. Fish Biol.* 47: 394-413.
- COLOMBO, G. y G. GRANDI, 1996 Histological study of the development and sex differentiation of the gonad in the European eel. *J. Fish Biol.* 48: 493-512.
- CONDEÇA, J. B., y A. V. M. Canario, 2001 Gonadal steroidogenesis in response to estradiol-17 β administration in the sea bream (*Sparus aurata* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 124: 82-96.
- CONOVER, D. O., 2004 Temperature-dependent sex determination in fishes, pp. 11-20 en *Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates*, editado por N. Valenzuela y N. y V. Lance. Smithsonian Books, Washington, DC.
- CONOVER, D. O. y B. E. KYNARD, 1981 Environmental sex determination: Interaction of temperature and genotype in a fish. *Science* 213: 577-579.
- COTTON, S. y C. WEDEKIND, 2007a. Control of introduced species using Trojan sex chromosomes. *Trends Ecol. Evol.* 22, 441-443.
- COTTON, S. y C. WEDEKIND, 2007b. Introduction of Trojan sex chromosomes to boost population growth. *J. Theor. Biol.* 249, 153-161.
- CUI, J. Z., X. Y. SHEN, Q. L. GONG, G. P. YANG y Q. Q. GU, 2006 Identification of sex markers by cDNA-AFLP in *Takifugu rubripes*. *Aquaculture* 257: 30-36.
- DARWIN, C., 1871. The descent of man, and selection in relation to sex. John Murray, Londres. (El origen del hombre y la selección en relación al sexo. 6.^a edición. Estudio preliminar de Faustino Córdón. Traducción de Julián Aguirre, Madrid, EDAF, 2004).
- D'COTTA H, A. FOSTIER, Y. GUIGUEN, M. GOVOROUN y J. F. BAROILLER, 2001a Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.* 59: 265-276.
- D'COTTA, H., A. FOSTIER, Y. GUIGUEN, M. GOVOROUN y J. F. BAROILLER, 2001b Search for genes involved in the temperature-induced gonadal sex differentiation in the tilapia, *Oreochromis niloticus*. *J. Exp. Zool.* 290: 574-585.
- DALLA VALLE, L., L. LUNARDI, L. COLOMBO y P. BELVEDERE, 2002 European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) cytochrome P450arom: cDNA cloning, expression and genomic organization. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80: 25-34.



- DELOFFRE, L., R. S. T. MARTINS, C. C. MYLONAS y A. V. M. CANARIO, 2009 Alternative transcripts of DMRT1 in the European sea bass expression during gonadal differentiation. *Aquaculture* (en prensa).
- DEVLIN, R.H. y Y. NAGAHAMA, 2002 Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191-364.
- DEVLIN, R. H., B. K. McNEIL, T. D. D. GROVES y E. M. DONALDSON, 1991 Isolation of a Y-chromosomal DNA probe capable of determining sex in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 1606-1612.
- DEVLIN, R. H., B. K. McNEIL, I. I. SOLAR y E. M. DONALDSON, 1994 A rapid PCR-based test for Y-chromosomal DNA allows simple production of all-female strains of chinook salmon. *Aquaculture* 128: 211-220.
- DONALDSON, E. M. y G. A. HUNTER, 1982 Sex control in fish with particular reference to salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 99-110 .
- EZAZ, T., R. STIGLEC, F. VEYRUNES y J. A. M. GRAVES, 2006 Relationship between vertebrate ZW and XY chromosome systems. *Curr. Biol.* 16: R736-R743.
- FELIP, A., S. ZANUY, M. CARRILLO y F. PIFERRER, 2001 Induction of triploidy and gynogenesis in teleost fish with emphasis on marine species. *Genetica* 111: 175-195.
- FELIP, A., F. PIFERRER, M. CARRILLO y S. ZANUY, 2002 Growth, gonadal development and sex ratios of meiogynogenetic diploid sea bass. *J. Fish Biol.* 61: 347-359.
- FELIP, A., W. P. YOUNG, P. A. WHEELER y G. H. THORGAARD, 2005 An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 247: 35-43.
- FENSKE, M. y H. SEGNER, 2004 Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 67: 105-126.
- FISHER, R.A., 1930 The Genetical Theory of Natural Selection. (A Complete Variorum Edition, editada por J. H. Bennett. Oxford University Press. Oxford, 318 pp., 2006).
- FRANCH R., B. LOURO, M. TSALAVOUTA, D. CHATZIPLIS, C.S. TSIQENOPOULUS, E. SARROPOULOU, J. ANTONELLO, A. MAGOULAS, C.C. MYLONAS, M. BABBUCCI, T. PATARNELLO, D.M. POWER, G. KOTOULAS y L. BARGELLONI, 2006 A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L. *Genetics* 174: 851-861.
- FRANCIS, R. C., 1992 Sexual lability in teleosts. *Quart. Rev. Biol.* 67: 1-18.
- FRISCH, A., 2001 Sex-change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic teleost fish. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 14: 481-499.
- FROSCHAUER, A., C. KÖRTING, T. KATAGIRI, T. AOKI, S. ASAKAWA, N. SHIMIZU, M. SCHARTL y J.-N. VOLFF, 2002 Construction and initial analysis of bacterial artificial chro-



- mosome (BAC) contigs from the sex-determining region of the platyfish *Xiphophorus maculeatus*. *Gene* 295: 247-254.
- GARCÍA-LÓPEZ, A., G. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ y C. SARASQUETE, 2005 Male reproductive system in Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup): anatomy, histology and histochemistry. *Histol. Histopathol.* 20: 1179-1189.
- GALAY-BURGOS, M., L. LLEWELLYN, C. C. MYLONAS, A. V. M. CANARIO, S. ZANUY y G. E. SWEENEY, 2004 Analysis of the Sox gene family in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 137: 279-84.
- GALAY-BURGOS M., C. GEALY, L. NAVARRO-MARTÍN, F. PIFERRER, S. ZANUY y G. E. SWEENEY, 2006 Cloning of the promoter from the gonadal aromatase gene of the European sea bass and identification of single nucleotide polymorphisms. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 145: 47-53.
- GEORGE, T. y T.J. PANDIAN, 1995 Production of ZZ females in the female-heterogametic black molly, *Poecilia sphenops*, by endocrine sex reversal and progeny testing. *Aquaculture* 136: 81-90.
- GILBERT, S.F., 1991. *Developmental Biology*, 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 891 pp.
- GILBERT, S. F., 2005 Mechanisms for the environmental regulation of gene expression: Ecological aspects of animal development. *J. Biosci.* 30: 65-74.
- GODWIN, J., J. A. LUCKENBACH y R. J. BORSKI, 2003 Ecology meets endocrinology: environmental sex determination in fishes. *Evol. Dev.* 5: 40-49.
- GONZÁLEZ, A., 2003 Actividad citocromo P450 aromatasa en la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). Tesis doctoral. Univ. Barcelona, 226 pp.
- GONZÁLEZ, A. y F. PIFERRER, 2002 Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *J. Exp. Zool.* 293: 500-510.
- GONZÁLEZ, A. y F. PIFERRER, 2003 Aromatase activity in the european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex and the annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132: 223-230.
- GRASSÉ, P.P., 1957 *Traité de Zoologie: Anatomie, Systématique, Biologie*. Tome XIII. Agnathes et Poissons. Masson, Paris.
- GRIFFITHS, R., K. J. ORR, A. ADAM y I. BARBER, 2000 DNA sex identification in the three-spined stickleback. *J. Fish Biol.* 57: 1331-1334.
- GUTIERREZ, J. B. y J. L. TEEM, 2006 A model describing the effect of sex-reversed YY fish in an established wild population: The use of a Trojan Y chromosome to cause extinction of an introduced exotic species. *J. Theor. Biol.* 241: 333-341.
- GUIGUEN, Y., J. F. BAROILLER, M. J. RICORDEL, K. ISEKI, O. M. McMEEL, S. A. MARTIN y A. FOSTIER, 1999 Involvement of estrogens in the process of sex differentia-



- tion in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol. Reprod. Dev.* 54: 154-162.
- GUIGUEN Y., A. FOSTIER, F. PIFERRER y C. F. CHANG, 2009. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* (En prensa).
- HALM S., G. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, L. RODRÍGUEZ, F. PRAT, C. C. MYLONAS, M. CARRILLO y S. ZANUY, 2004 Cloning, characterisation, and expression of three oestrogen receptors (ER α , ER β 1 and ER β 2) in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Mol. Cell Endocrinol.* 223: 63-75.
- HALM, S. A. ROCHA, T. MIURA, F. PRAT y S. ZANUY, 2007 Anti-Müllerian hormone (AMH) in the sea bass: Its gene structure, regulatory elements, and expression of alternatively-spliced isoforms. *Gene* 388: 148-158.
- HARDY, I.C.W., 2002. Sex ratios. Concepts and Research Methods. Cambridge University Press. Cambridge, 424 pp.
- HATTORI, R. S., R. J. GOULD, T. FUJIOKA, T. SAITO, J. KURITA, C. A. STRÜSSMANN, M. YOKOTA y S. WATANABE, 2007 Temperature-dependent sex determination in Hd-rR medaka *Oryzias latipes*: gender sensitivity, thermal threshold, critical period, and DMRT1 expression profile. *Sex. Dev.* 1: 138-146.
- HAWKINS M. B., J. W. THORNTON, D. CREWS, J. K. SKIPPER, A. DOTTE y P. THOMAS, 2000 Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10751-10756.
- HE, C. L., J. L. DU, G. C. WU, Y. H. LEE, L. T. SUN y C. F. CHANG, 2003 Differential Dmrt1 transcripts in gonads of the protandrous black porgy, *Acanthoparus schlegelii*. *Cytogenet. Genome Res.* 101: 309-313.
- HERPIN, A., D. SCHINDLER, A. KRAISS, U. HORNING, C. WINKLER y M. SCHARTL, 2007 Inhibition of primordial germ cell proliferation by the medaka male deremining gene Dmrt1bY. *BMC Dev. Biol.* 7:99.
- HOWELL, B. R., S. M. BAYNES y D. THOMPSON, 1995 Progress towards the identification of the sex determining mechanism of the *Solea solea* (L.), by induction of diploid gynogenesis. *Aquacult. Res.*, 26: 135-140.
- HULATA, G., 2001 Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica* 111: 155-173.
- HUSEBYE H., S. LUND, M. MOLLER, A. SUNDE y H. E. KROKAN, 1994 A Bkm-related DNA-sequence gives individual DNA fingerprints in turbot (*Scophthalmus maximus*), but neither Bkm-related, human SRY or human ZFY probes detect genetic sex differences. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 107: 69-73.
- IMSLAND, A. K., A. FOLKVORD, G. L. GRUNG y O. STEFANSSON, 1997 Sexual dimorphism in growth and maturation of turbot (*Scophthalmus maximus*) (Rafinesque, 1810). *Aquacult. Res.* 28: 101-114.



- ITURRA, P., J. F. MEDRANO, M. BAGLEY, N. LAM, N. VERGARA y J. C. MARIN, 1998. Identification of sex chromosome molecular markers using RAPDs and fluorescent in situ hybridization in rainbow trout. *Genetica* 101: 209-213.
- JENG S. R., S. DUFOUR y C. F. CHANG, 2005 Differential expression of neural and gonadal aromatase enzymatic activities in relation to gonadal development in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J. Exp. Zool.* 303: 802-812.
- KALLMAN, K. D., 1984 A new look at sex determination in Poeciliid fishes, pp. 95-171 en *Evolutionary Genetics of Fishes*, editado por B. J. Turner. Plenum Publ. Corp., Nueva York.
- KANAMORI, A., A. YARNAMURA, S. KOSHIBA, J.S. LEE, E.F. ORLANDO y H. HORI, 2006 Methyltestosterone efficiently induces male development in the self-fertilizing hermaphrodite fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Genesis* 44: 495-503.
- KANDA H., M. KOJIMA, N. MIYAMOTO, M. ITO, N. TAKAMATSU, S. YAMASHITA y T. SHIBA, 1998 Rainbow trout Sox24, a novel member of the Sox family, is a transcriptional regulator during oogenesis. *Gene* 211: 251-257.
- KARUBE, M., J. I FERNANDINO , P. STROBL-MAZZULLA , C. A STRÜSSMANN, G. YOSHIZAKI, G.M. SOMOZA y R. PATIÑO, 2007 Characterization and expression profile of the ovarian cytochrome P-450 aromatase (cyp19A1) gene during thermolabile sex determination in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. *J. Exp. Zool. A* 307: 625-636.
- KAWAMURA, T., S. OMURA, S. SAKAI y I. YAMASHITA, 2003 No effects of estrogen receptor overexpression on gonadal sex differentiation and reversal in medaka fish. *Zool. Sci.* 20: 43-47.
- KAZETO Y y J.M. TRANT, 2005 Molecular biology of channel catfish brain cytochrome P450 aromatase (CYP19A2): cloning, preovulatory induction of gene expression, hormonal gene regulation and analysis of promoter region. *J. Mol. Endocrinol.* 35: 571-583.
- KAZETO, Y., S. IJIRI, A. R. PLACE, Y. ZOHAR y J. M. TRANT, 2001 The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 288: 503-508.
- KHUL, A. J., C. S MANNING y M. BROUWER, 2005 Brain Aromatase in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*): Molecular characterization and role in xenoestrogen induced sex reversal. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 96: 67-77.
- KIKUCHI, K., W. KAI, A. HOSOKAWA, N. MIZUNO, H. SUETAKE, K. ASAHINA y Y. SUZUKI, 2007 The sex-determining locus in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Genetics* 175: 2039-2042.
- KIM S., J. K. OGASAWARA, J. G. PARK, A. TAKEMURA y M. NAKAMURA, 2002 Sequence and expression of androgen receptor and estrogen receptor gene in the sex types of protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 127: 165-173.



- KIM, Y., A. KOBAYASHI, R. SEKIDO, L. DiNAPOLI, J. BRENNAN, M-C. CHABOISSIER, F. POULAT, R. R. BEHRINGER, R. LOVELL-BADGE y B. CAPEL, 2006 Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. PLoS Biol. 4: 1000-1009.
- KISHIDA M. y G. V. CALLARD, 2001 Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. Endocrinology 142: 740-750.
- KITANO, T., K. TAKAMUNE, T. KOBAYASHI, Y. NAGAHAMA y S. I. ABE, 1999 Suppression of p450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). J. Mol. Endocrinol. 23: 167-176.
- KITANO T, K. TAKAMUNE, Y. NAGAHAMA y S. I. ABE, 2000 Aromatase inhibitor and 17alpha-methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Mol. Reprod. Dev. 56: 1-5.
- KLUVER, N., F. PFENNIG, I. PALA, K. STORCH, M. SCHLIEDER, A. FROSCHAUER, H.O. GUTZEIT y M. SCHARTL, 2007 Differential expression of anti-mullerian hormone (*amh*) and anti-Mullerian hormone receptor type II (*amhrl1*) in the teleost medaka. Dev. Dyn. 236: 271-281.
- KOBAYASHI, Y., T. SUNOBE, T. KOBAYASHI, M. NAKAMURA, N. SUZUKI y Y. NAGAHAMA, 2005 Molecular cloning and expression of Ad4BP/SF-1 in the serial sex changing gobiid fish, *Trimma okinawae*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 332: 1073-1080.
- KOMATSU, T., S. NAKAMURA y M. NAKAMURA, 2006 A sex cord-like structure and some remarkable features in early gonadal sex differentiation in the marine teleost *Siganus guttatus* (Bloch). J. Fish Biol. 68: 236-250.
- KONDO, M., I. NANDA, U. HORNING, S. ASAKAWA, N. SHIMIZU, H. MITANI, M. SCHMID, A. SHIMA y M. SCHARTL, 2003 Absence of the candidate male sex-determining gene dmrt1b(Y) of Medaka from other fish species. Curr. Biol. 13: 416-420.
- KRAAK, S. B. M. y E.M.A DE LOOZE, 1993 A new hypothesis based on the evolution of sex determination in vertebrates; big females ZW, big males XY. Neth. J. Zool. 43: 260-273.
- KROON, F. J., P. L. MUNDAY, D. A. WESTCOTT, J. P. A. HOBBS y N. R. LILEY, 2005 Aromatase pathway mediates sex change in each direction. Proc. R. Soc. B 272: 1399-1405.
- KRUG, H.M., 1990 The Azorean blackspot seabream *Pagellus bogaraveo* Brun-nich 1768 Teleostei Sparidae. Reproductive cycle, hermaphroditism, maturity and fecundity. Cybium 14: 151-159.
- KWON J. Y., V. HAGHPANAH, L. M. KOGSON-HURTADO, B. J. McANDREW y P. J. PENMAN, 2000 Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)



- by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *J. Exp. Zool.* 287: 46-53.
- KWON, J. Y., B. J. McANDREW y D. J. PENMAN, 2002 Treatment with an aromatase inhibitor suppresses high-temperature feminization of genetic male (YY) Nile tilapia. *J. Fish Biol.* 60: 625-636.
- LACADENA, J.R., 1998. Protoginia y protandria: Determinismo genético y diferenciación sexual, pp.143-162 en *La Evolución de la Sexualidad y los Estados Intersexuales* editado por J. Botella y A. Fernández de Molina. Ediciones Díaz de Santos, Madrid.
- LAGOMARSINO, I. V. y D. O. CONOVER, 1993 Variation in environmental and genotypic sex-determining mechanisms across a latitudinal gradient in the fish, *Menidia menidia*. *Evolution* 47: 487-94.
- LAWRENCE, C., J. P. EBERSOLE y R. V. KESSELI, 2008 Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Biol. Fish.* 81: 239-246.
- LEE, B. Y. y T. D. KOCHER, 2007 Exclusion of *Wilms tumour (WT1b)* and *ovarian cytochrome P450 aromatase (CYP19A1)* as candidates for sex determination genes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Anim. Genet.* 38: 85-86.
- LEE, B. Y., D. J. PENMAN y T. D. KOCHER, 2003 Identification of a sex-determining region in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using bulked segregant analysis. *Anim. Genet.* 34: 379-383.
- LI, Y., J. A. HILL, G. H. YUE, F. CHEN y L. ORBAN, 2002 Extensive search does not identify genomic sex markers in *Tetraodon nigroviridis*. *J. Fish Biol.* 61: 1314-1317.
- LIU, Q., C. A. GOUDIE, B. A. SIMCO y K. B. DAVIS, 1996 Sex linkage of glucose-phosphate isomerase-B and mapping of the sex-determining gene in channel catfish. *Cytogenet. Cell Genet.* 73:282-285.
- LIU, S., M. GOVOROUN, H. D'COTTA, M. J. RICORDEL, J. J. LAREYRE, O. M. McMEEL, T. SMITH, Y. NAGAHAMA y Y. GUIGUEN, 2000 Expression of cytochrome P45011beta (11beta-hydroxylase) gene during gonadal sex differentiation and spermatogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 75: 291-298.
- LUCKENBACH, J. A., L. W. EARLY, A. H. ROWE, R. J. BORSKI, H. V. DANIELS y J. GODWIN, 2005 Aromatase cytochrome P450: Cloning, intron variation, and ontogeny of gene expression in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *J. Exp. Zool. A* 303: 643-656.
- MAAK, G., H. SEGNER y C. R. TYLER, 2003 Ontogeny of sexual differentiation in different strains of zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Physiol. Biochem.* 28: 125-128.



- MANABE H., M. ISHIMURA, A. SHINOMIYA y T. SUNOBE, 2007 Field evidence for bi-directional sex change in the polygynous gobiid fish *Trimma okinawae*. J. Fish Biol. 70: 600-609.
- MANK, J. E., D. E. L. PROMISLOW y J. C. AVISE, 2006 Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. Biol. J. Linnean. Soc. 87: 83-93.
- MARCHAND O., M. GOVOROUN, H. D'COTTA, O. MCMEEL, J. LAREYRE, A. BERNOT, V. LAUDET y Y. GUIGUEN, 2000 DMRT1 expression during gonadal differentiation and spermatogenesis in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Biochim. Biophys. Acta 1493: 180-187.
- MATSUDA, M., 2003 Sex determination in fish: lessons from the sex-determining gene of the teleost medaka, *Oryzias latipes*, Dev. Growth Differ. 45: 397-403.
- MATSUDA, M., 2005 Sex determination in the teleost medaka, *Oryzias latipes*. Ann. Rev. Genet. 39: 293-307.
- MATSUDA, M., Y. NAGAHAMA, A. SHINOMIYA, T. SATO, C. MATSUDA, T. KOBAYASHI, C.E. MORREY, N. SHIBATA, S. ASAKAWA, N. SHIMIZU, H. HORI, S. HAMAGUCHIY y M. SAKAIZUMI, 2002 DMY is a Y-specific, DM-domain gene required for male development in the medaka (*Oryzias latipes*). Nature 417: 559-563.
- MATSUDA, M., A. SHINOMIYA, M. KINOSHITA, A. SUZUKI, T. KOBAYASHI, B. PAUL-PRASANTH, E. LAU, S. HAMAGUCHI, M. SAKAIZUMI y Y. NAGAHAMA, 2007 DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 3865-3870.
- MATSUOKA, M. P., S. VAN NES, O. ANDERSEN, T. J. BENFEY y M. REITH, 2006 Real-time PCR analysis of ovary- and brain-type aromatase gene expression during Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) development. Comp. Biochem. Physiol. B 144: 128-135.
- MAYNARD SMITH, J., 1978 The Evolution of Sex. Cambridge University Press, Cambridge.
- MENUET, A., E. PELLEGRINI, I. ANGLADE, O. BLAISE, V. LAUDET, O. KAH y F. PAKDEL, 2002 Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. Biol. Reprod. 66: 1881-1892.
- MIGUEL-QUERALT, S., M. BLÁZQUEZ, F. PIFERRER y G. L. HAMMOND, 2007 Sex hormone-binding globulin expression in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) throughout development and the reproductive season. Mol. Cell. Endocrinol. 276: 55-62.
- MITTWOCH, U., 2006 Sex is a threshold dichotomy mimicking a single gene effect. Trend Genet. 22: 96-100.
- MIURA, S., S. NAKAMURA, Y. KOBAYASHI, F. PIFERRER y M. NAKAMURA, 2008 Differentiation of ambisexual gonads and immunolocalization of P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme during gonadal sex differentiation in the pro-



- tandrous anemonefish, *Amphiprion clarkii*. Comp. Biochem. Physiol. B 149: 29-37.
- MOLES, G., M. CARRILLO, E. MANANOS, C. C. MYLONAS y S. ZANUY, 2005 Temporal profile of brain and pituitary GnRHs, GnRH-R and gonadotropin mRNA expression and content during early development in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Gen. Comp. Endocrinol. 150: 75-86.
- MORREY, C. M., M. NAKAMURA, T. KOBAYASHI, E. G. GRAU y Y. NAGAHAMA, 1998 P450_{scc}-like immunoreactivity throughout gonadal restructuring in the protogynous hermaphrodite *Thalassoma duperrey*. Int. J. Dev. Biol. 42: 811-816.
- MYLONAS, C. C., L. ANEZAKI, P. DIVANACH, S. ZANUY, F. PIFERRER, B. RON, A. PEDUEL, I. BEN ATIA, S. GORSHKOV y A. TANDLER, 2005 Influence of rearing temperature during the larval and nursery periods on growth and sex differentiation in two Mediterranean strains of *Dicentrarchus labrax*. J. Fish Biol. 67: 652-668.
- NAGAHAMA, Y., 2005 Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish. Fish Physiol. Biochem. 31: 105-109.
- NAKAMOTO, M., A. SUZUKI, M. MATSUDA, Y. NAGAHAMA y N. SHIBATA, 2005 Testicular type Sox9 is not involved in sex determination but might be in the development of testicular structures in the medaka, *Oryzias latipes*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 333: 729-736.
- NAKAMURA, S., D. KOBAYASHI, Y. AOKI, H. YOKOI, Y. EBE, J. WITTBRODT y M. TANAKA, 2006 Identification and lineage tracing of two populations of somatic gonadal precursors in medaka embryos. Dev. Biol. 295: 678-688.
- NAKAMURA M., T. KOBAYASHI, X. T. CHANG y Y. NAGAHAMA, 1998 Gonadal sex differentiation in teleost fish. J. Exp. Zool. 281: 362-372.
- NAKAMURA, M., Y. KOBAYASHI, S. MIURA, M. A. ALAM y R. K BHANDARI, 2005 Sex change in coral reef fish. Fish Physiol. Biochem. 31: 117-122.
- NANDA, I., M. SCHARTL, W. FEICHTINGER, J. T. EPPLER y M. SCHMID, 1992 Early stages of sex chromosome differentiation in fish as analysed by simple repetitive DNA sequences. Chromosoma 101: 301-310.
- NANDA, I., M. KONDO, U. HORNUNG, S. ASAKAWA, C. WINKLER, A. SHIMIZU, Z.H. SHAN, T. HAAF, N. SHIMIZU, A. SHIMA, M. SCHMID y M. SCHARTL, 2002 A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11778-11783.
- NAVARRO-MARTÍN, L., J. VIÑAS, A. GUTIÉRREZ, L. DI CROCE y F. PIFERRER. 2007. Sex-dependent differences in DNA-methylation levels in the promoter of the gonadal aromatase gene in a fish, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), pp. 32 en *8th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*. (3-8 de junio, 2007. Saint-Malo, Francia), editado por G. Roudaut, C. Labbé y J. Bobe. Université de Rennes I. Rennes.



- NAVARRO-MARTÍN, L., M. GALAY-BURGOS, G. SWEENEY y F. PIFERRER, 2009a. European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) *sox17*. Molecular cloning, gene structure, tissue distribution, and expression during early development and throughout sex differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 160: 3-11.
- NAVARRO-MARTÍN, L., M. BLÁZQUEZ, J. VIÑAS y F. PIFERRER, 2009b. Balancing the effects of rearing at low temperature during early development on sex ratios, growth and maturation in the European sea bass. Limitations and opportunities for the production of all-female stocks. *Aquaculture (sometido)*.
- NELSON, J. S., 2006 *Fishes of the World*. Wiley, New Jersey, 601 pp.
- OLDFIELD, R.G. 2005. Genetic, abiotic and social influences on sex differentiation in cichlid fishes and the evolution of sequential hermaphroditism. *Fish Fish.* 6: 93-110.
- OLSSON, P. E., A. H. BERG, J. VON HOFSTEN, B. GRAHN, A. HELLQVIST, A. LARSSON, J. KARLSSON, C. MODIG, B. BORG y P. THOMAS, 2005 Molecular cloning and characterization of a nuclear androgen receptor activated by 11-ketotestosterone. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3: Art. No. 37.
- OSPINA-ÁLVAREZ, N. y F. PIFERRER, 2008 Temperature-dependent sex determination in fish revisited. Prevalence, existence of a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS One* 3(7): e2837.
- PAPADAKI, M., F. PIFERRER, S. ZANUY, E. MAINGOT, E. DIVANACH y C.C. MYLONAS, 2005 Growth, sex differentiation and gonad plasma levels of sex steroids in male- and female-dominant populations of *Dicentrarchus labrax* obtained through repeated size grading. *J. Fish Biol.* 66: 1-19.
- PARENTI, L. y H. J. GRIER, 2004 Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integr. Comp. Biol.* 44: 333-348.
- PARKER, G.A., 1992 The evolution of sexual size dimorphism in fish. *J. Fish Biol.* 41 (suppl. B): 1-20.
- PASSAKAS, T., 1981 Comparative studies on the chromosomes of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) and the American eel (*Anguilla rostrata* Le Sueur). *Folia Biologica* 29: 41-58.
- PAUL-PRASANTH, B., M. MATSUDA, E. L. LAU, A. SUZUKI, F. SAKAI, T. KOBAYASHI y Y. NAGAHAMA, 2006 Knock-down of DMY initiates female pathway in the genetic male medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 351: 815-819.
- PEICHEL C. L., J. A. ROSS, C. K. MATSON, M. DICKSON, J. GRIMWOOD, J. SCHMUTZ, J. R. MYERS, S. MORI, D. SCHLUTER y D. KINGSLEY, 2004 The master sex-determination locus in threespine sticklebacks is on a nascent Y chromosome. *Curr. Biol.* 14: 1416-1424.
- PENMAN D. J. y F. PIFERRER, 2008 Fish gonadogenesis. Part 1. Genetic and environmental mechanisms of sex determination. *Rev. Fish. Sci.* 16(S1): 16-34.



- PIEAU, C., 1996 Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays* 18: 19-26.
- PIFERRER, F., 1990. Hormonal manipulation of the process of sex differentiation in Pacific salmon. Tesis doctoral. Univ. Barcelona, 399 pp.
- PIFERRER, F., 2001 Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197: 229-281.
- PIFERRER, F., 2007 Mecanismos de determinación y diferenciación sexual en los peces, su control y aplicaciones en acuicultura, pp.141-150 en *Actas del XI Congr. Nac. Acuicult.* Vol. 1, editado por A. Cerviño, A. Guerra y C. Pérez.
- PIFERRER, F. y E.M. DONALDSON, 1994a Uptake and clearance of exogenous estradiol-17 β and testosterone during the early development of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), including eggs, alevins and fry. *Fish Physiol. Biochem.* 13: 219-232.
- PIFERRER, F. y L. C. LIM, 1997 Application of sex reversal technology in ornamental fish culture. *Aquar. Sci. Conserv.* 1: 113-118.
- PIFERRER, F. y M. BLÁZQUEZ, 2005 Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiol. Biochem.* 31: 215-226.
- PIFERRER, F. y Y. GUIGUEN, 2008 Fish gonadogenesis. Part 2. Molecular biology and genomics of sex differentiation *Rev. Fish. Sci.* 16(S1): 35-55.
- PIFERRER, F., I. J. BAKER, y E. M. DONALDSON, 1993 Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 91: 59-65.
- PIFERRER, F., S. ZANUY, M. CARRILLO, I. I. SOLAR, R. H. DEVLIN y E. M. DONALDSON, 1994a Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. *J. Exp. Zool.* 270: 255-62.
- PIFERRER, F., M. CARRILLO, S. ZANUY, I.I. SOLAR y E.M. DONALDSON, 1994b Induction of sterility in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) by androgen immersion before first feeding. *Aquaculture* 119: 409-423.
- PIFERRER, F., M. BLÁZQUEZ, L. NAVARRO y A. GONZÁLEZ, 2005 Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 142: 102-110.
- PIFERRER, F., A. FELIP y R. M. CAL, 2007 Inducción de la triploidía y ginogénesis para la obtención de peces estériles y poblaciones monosexo en acuicultura, pp. 403-472 en *Genética y Genómica en Acuicultura*, editado por P. Martínez y A. Figueras. Observatorio Español de Acuicultura, Madrid.



- PIFERRER, F., A. BEAUMONT, J. C. FALGUIÈRE, M. FLAJSHANS, P. HAFFRAY y L. COLOMBO, 2009. Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. Aquaculture (en prensa).
- PLACE, A. R. y V. A. LANCE, 2004 The TSD drama: same cast, different stars, pp. 99-110 en Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates, editado por N. Valenzuela y V. Lance. Smithsonian Books, Washington D.C.
- PRICE, D. J., 1984 Genetics of sex determination in fishes: a brief review, pp. 77-89 en Fish reproduction: Strategies and tactics, editado por G. W. Potts and y R. J. Wootton. Academic Press, London.
- RICE, W. R., 1986 On the instability of polygenic sex determination: the effect of sex-specific selection. Evolution 40: 633-639.
- RIZZO, G., y M. SPAGNOLO, 1996 A model for the optimal management of sea bass *Dicentrarchus labrax* aquaculture. Mar. Res. Econ. 11: 267-286.
- RÖMER, U. y W. BEISENHERZ, 1996 Environmental determination of sex in *Apistogramma* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). J. Fish Biol. 48: 714-725.
- ROSS, R.M. 1990. The evolution of sex-change mechanisms in fishes. Env. Biol. Fishes 29, 81-93.
- RUBIN, D.A., 1985. Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). Copeia 1985: 233-235.
- SADOVY, Y. y D.Y. SHAPIRO, 1987 Criteria for the diagnosis of hermaphroditism in fishes. Copeia 1987: 136-156.
- SADOVY, Y. y M. LIU, 2008. Functional hermaphroditism in teleosts. Fish Fisher., 9: 1-43.
- SAILLANT, E., A. FOSTIER, B. MENU, P. HAFFRAY y B. CHATAIN, 2001 Sexual growth dimorphism in sea bass *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture 202: 371-387.
- SAILLANT, E., A. FOSTIER, P. HAFFRAY, B. MENU, J. THIMONIER y B. CHATAIN, 2002 Temperature effects and genotype-temperature interactions on sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). J. Exp. Zool. 292: 494-505.
- SAILLANT, E., A. FOSTIER, P. HAFFRAY, B. MENU y B. CHATAIN. 2003a. Saline preference for the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, larvae and juveniles: effect of salinity on early development and sex determination. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 287: 103-117.
- SAILLANT E., A. FOSTIER, P. HAFFRAY, B. MENU, S. LAUREAU, J. THIMONIER y B. CHATAIN, 2003b Sexual differentiation and juvenile intersexuality in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). J. Zool. 260: 53-63.



- SAILLANT, E., M. DUPONT-NIVET, P. HAFFRAY y B. CHATAIN, 2006 Estimates of heritability and genotype-environment interactions for body weight in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) raised under communal rearing conditions. *Aquaculture* 254: 139-147.
- SARRE, S., A. GEORGES y A. QUINN, 2004 The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Bioessays* 26: 639-645.
- SCHARTL, M., 2004a Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14: 634-641.
- SCHARTL, M., 2004b Comparative view on sex determination in medaka. *Mech. Dev.* 121: 639-645.
- SCHLUPP, I., 2005. The evolutionary ecology of gynogenesis. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36: 399-417.
- SCHULZ, R.J., 1967. Gynogenesis and triploidy in the viviparous fish *Peciliopsis*. *Science* 157: 1564-1567.
- SHARMA, O. P., N.K. TRIPATHI, 1988 Female heterogamety in two teleostean fishes. *Cytologia* 53: 81-86.
- SLANCHEV, K., J. STEBLER, G. DE LA CUEVA-MENDEZ y E. RAZ, 2005 Development without germ cells: The role of the germ line in zebrafish sex differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 4074-4079.
- SOCORRO, S., R. S. MARTINS, L. DELOFFRE, C. C. MYLONAS y A.V.M. CANARIO, 2007 A cDNA for European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) 11 β -hydroxylase: Gene expression during the thermosensitive period and gonadogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 150: 164-173.
- SOLAR, I. I. y E.M. DONALDSON, 1991 A comparison of the economic aspects of monosex chinook salmon production versus mixed sex stocks for aquaculture. *Bull. Aquacult. Assoc. Can.* 91: 28-30.
- SOLARI, A. J., 1994 Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates. CRC Press, Boca Raton, FL.
- SOLÉ, M., D. RALDUA, F. PIFERRER, D. BARCELÓ y C. PORTE, 2003. Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comp. Biochem. Physiol. C* 136: 145-156.
- STEIN, J., R. B. PHILLIPS y R. H. DEVLIN, 2001 Identification of the Y chromosome in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Cytogenet. Cell Genet.* 92: 108-110.
- STROBL-MAZZULLA, P. H., N. P. MONCAUT, G. C. LÓPEZ, L. A. MIRANDA, A. V. CANARIO y G. M. SOMOZA, 2005 Brain aromatase from pejerrey fish (*Odontesthes bonariensis*): cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. *Gen. Comp. Endocrinol.* 143: 21-32.



- STRÜSSMANN, C. A. y R. PATIÑO, 1999 Sex Determination, Environmental, pp. 402-409 en Encyclopedia of Reproduction, editado por E. Knobil y J. D. Neill, Academic Press, San Diego.
- STRÜSSMANN, C. A. y M. NAKAMURA, 2002 Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiol. Biochem.* 26: 13-29.
- STRÜSSMANN, C. A. y L. S. ITO, 2005 Where does gonadal sex differentiation begin? Gradient of histological sex differentiation in the gonads of pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atherinidae). *J. Morphol.* 265: 190-196.
- STRÜSSMANN, C. A., J. C. CALSINA-COTA, G. PHONLOR, H. HIGUCHI y F. TAKASHIMA, 1996 Temperature effects on sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatcheri*. *Environ. Biol. Fishes* 47: 143-154.
- SUDHAKUMARI, C. C., T. KOBAYASHI, H. KAJIURA-KOBAYASHI, D. S. WANG, M. YOSHIKUNI, Y. NAGAHAMA y B. SENTHILKUMARAN, 2005 Ontogenic expression patterns of several nuclear receptors and cytochrome P450 aromatases in brain and gonads of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* suggests their involvement in sex differentiation. *Fish Physiol. Biochem.* 31: 129-135.
- SUNOBE T. y A. NAKAZONO, 1993 Sex change in both directions by alternation of social dominance in *Trimma okinawae*. *Ethology* 94: 339-345.
- TANAKA, M., S. FUKADA, M. MATSUYANMA y Y. NAGAHAMA, 1995 Structure and promoter analysis of the cytochrome P450 aromatase gene of the teleost fish, medaka *Oryzias latipes*. *J. Biochem.* 117: 719-725.
- TCHOUDAKOVA, A., M. KISHIDA, E. WOOD y G. V. CALLARD, 2001 Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78: 427-439.
- TESSEMA, M., A. MULLER-BELECKE y G. HORSTGEN-SCHWARK, 2006 Effect of rearing temperatures on the sex ratios of *Oreochromis niloticus* populations. *Aquaculture* 258: 270-277.
- THORGAARD, G. H., 1977 Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. *Science* 196: 900-902.
- TONG, S.K. y B.C. CHUNG, 2003 Analysis of zebrafish cyp19 promoters. *J. Ster. Biochem. Mol. Biol.* 86: 381-386.
- TRANT, J. M., S. GAVASSO, J. ACKERS, B. C. CHUNG y A. R. PLACE, 2001 Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J. Exp. Zool.* 290: 475-483.
- UCHIDA, D., M. YAMASHITA, T. KITANO y T. IGUCHI, 2002 Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J. Exp. Biol.* 205: 711-718.



- UCHIDA, D., M. YAMASHITA, T. KITANO y T. IGUCHI, 2004 An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp. Biochem. Physiol. A* 137: 11-20.
- ULLER, T., I. PEN, E. WAPSTRA, L.W. BEUKEBOOM y J. KOMEDUR, 2007. The evolution of sex ratios and sex-determining systems. *Trends Ecol. Evol.* 22: 292-297.
- VAN NES, S. y O. ANDERSEN, 2006 Temperature effects on sex determination and ontogenic gene expression of the aromatases *cyp19a* and *cyp19b*, and the estrogen receptors *esr1* and *esr2* in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Mol. Reprod. Dev.* 73: 1481-1490.
- VAN NES, S., M. MOE y O. ANDERSEN, 2005 Molecular characterization and expression of two *cyp19* (P450 aromatase) genes in embryos, larvae, and adults of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Mol. Reprod. Dev.* 72: 437-449.
- VALENZUELA, N., D. C. ADAMS y F. J. JANZEN, 2003 Pattern does not equal process: exactly when is sex environmentally determined?. *Am. Nat.* 161: 676-683.
- VANDEPUTTE, M., M. DUPONT-NIVET, H. CHAVANNE y B. CHATAIN, 2007 A polygenic hypothesis for sex determination in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Genetics* 176: 1049-1057.
- VIÑAS, J. y F. PIFERRER, 2008. Stage-Specific Gene Expression During Fish Spermatogenesis as Determined by Laser Capture Microdissection and Quantitative-PCR in Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Gonads. *Biol. Reprod.* 79: 738-747.
- VIZZIANO, D., G. RANDUINEAU, D. BARON, C. CAUTY y Y. GUIGUEN, 2007 Characterization of early molecular sex differentiation in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Dyn.* 236: 2198-2206.
- VRIJENHOEK, R.C., R.M., C.J. COLE y J.P. BOGART, 1989. A list of the known unisexual vertebrates, pp. 19-23, en *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*, editado por R. M. Dawley y R. P. Bogart. *Bulletin New York State Mus.*, Albany, Nueva York.
- VOLFF, J. N., M. KONDO y M. SCHARTL, 2003 Medaka *dmY/dmrt1Y* is not the universal primary sex-determining gene in fish. *Trends Genet.* 19: 196-199.
- VOLFF, J. N., I. NANDA, M. SCHMID y M. SCHARTL, 2007 Governing sex determination in fish: regulatory pushes and ephemeral dictators. *Sex. Dev.* 1: 85-99.
- WANG, D. S., T. KOBAYASHI, B. SENTHILKUMARAN, F. SAKAI, C. C. SUDHAKUMARI, T. SUZUKI, M. YOSHIKUNI, M. MATSUDA, K, K-I. MOROHASHI y Y. NAGAHAMA, 2002 Molecular cloning of *DAX1* and *SHP* cDNAs and their expression patterns in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 297: 632-640.



- WANG, D. S., T., KOBAYASHI, L. Y. ZHOU, B. PAUL-PRASANTH, S. IJIRI, F. SAKAI, K. OKUBO, K.I. MOROHASHI y Y. NAGAHAMA, 2007 Foxl2 up-regulates aromatase gene transcription in a female-specific manner by binding to the promoter as well as interacting with Ad4 binding protein/steroidogenic factor 1. *Mol. Endocrinol.* 21: 712-725.
- WARNER, R.R. 1988. Sex change in fishes: hypothesis, evidence, and objectives. *Env. Biol. Fishes* 22, 81-90.
- WEICHERT, C.K., W. PRESCH, 1981. Elementos de Anatomía de los Cordados (4.^a ed.). McGraw-Hill. México, 531 pp.
- WEN, C. M., Z. H. ZHANG, W. P. MA, M. XU, Z. L. WEN y J. R. PENG, 2005 Genome-wide identification of female enriched genes in zebrafish. *Dev. Dyn.* 232: 171-179.
- WONG T. T., S. IJIRI y Y. ZOHAR, 2006 Molecular biology of ovarian aromatase in sex reversal: complementary DNA and 5'-flanking region isolation and differential expression of ovarian aromatase in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biol. Reprod.* 74: 857-64.
- WORAM, R. A., K. GHARBI, T. SAKAMOTO, B. HOYHEIM, L. E. HOLM, K. NAISH, C. MCGOWAN, M. M. FERGUSON, R. B. PHILLIPS, J. STEIN, R. GUYOMARD, M. CAIRNEY, J. B. TAGGART, R. POWELL, W. DAVIDSON y R. G. DANZMANN, 2003 Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in Salmonid fishes. *Genome Res.* 13: 272-280.
- YAMAGUCHI, T., S. YAMAGUCHI, T. HIRAI, 2007. Follicle-stimulating hormone signaling and Foxl2 are involved in transcriptional regulation of aromatase gene during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 359: 935-940.
- YAMAMOTO, T., 1969 Sex differentiation, pp. 117-175 en *Fish Physiology*, vol 3: Reproduction, editado por W.H. Hoar y D.J. Randall. Academic Press, Nueva York.
- YAMAMOTO, E., 1999 Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture* 173: 235-246.
- YOSHINAGA, N., E. SHIRAISHI, T. YAMAMOTO, T. IGUCHI, S. ABE y T. KITANO, 2004 Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Müllerian inhibiting substance during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 322: 508-513.
- YOSHIURA, Y., B. SENTHILKUMARAN, M. WATANABE, Y. OBA, T. KOBAYASHI y Y. NAGAHAMA, 2003 Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*,



during vitellonogenesis suggests transcriptional interaction. Biol. Reprod., 68: 1545-1553.

ZANUY, S., M. CARRILLO, A. FELIP, L. RODRÍGUEZ, M. BLÁZQUEZ, J. RAMOS y F. PIFERRER, 2001 Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). Aquaculture 202: 187-203.

ZHANG, J., 2004 Evolution of *DMY*, a newly emergent male sex-determination gene of medaka fish. Genetics 166: 1887-1895.

ZOHAR, Y., M. ABRAHAM y H. GORDIN, 1978 The gonadal cycle of the captivity-reared hermaphroditic teleost *Sparus aurata* (L.) during the first two years of life. Ann. Biol. Anim. Biochim. 18: 877-882.

GLOSARIO

- **Autosomas.** Cromosomas que no son *cromosomas sexuales*. Su número es igual en machos y hembras de una misma especie.
- **Cambio de sexo («sex change»).** Proceso presente en los *hermafroditas* secuenciales mediante el cual los animales reorganizan sus gónadas para producir el tipo de gametos distinto al producido en la última maduración sexual. Según la polaridad del cambio de sexo, las especies que lo experimentan se clasifican en *proterándricas* (macho → hembra) o *proterogíneas* (hembra → macho).
- **Cromosomas sexuales.** Cromosomas que determinan el sexo de una especie. El sistema más común de determinación sexual presenta machos *heterogaméticos* (XY) y hembras homogaméticas (XX). En los mamíferos los cromosomas sexuales son un único par y son *heteromorfos*, por lo que los cromosomas sexuales se llaman también *heterocromosomas*, pero en los peces puede haber uno o más pares y lo más frecuente es que sean *homomorfos*.
- **Cromosomas sexuales heteromorfos.** *Cromosomas sexuales* distintos según el sexo. En el sistema XX (hembras) / XY (machos) las hembras poseen dos cromosomas sexuales idénticos mientras que en los machos son distintos en forma y tamaño (XY).
- **Cromosomas sexuales homomorfos.** *Cromosomas sexuales* que tienen el mismo tamaño y forma en machos y hembras. Pueden distinguirse mediante métodos indirectos. Muy frecuentes en los peces.



- **Determinación sexual.** Proceso genético o ambiental mediante el cual se establece el género (macho, hembra) de un individuo. En la determinación del sexo siempre hay una componente genética, incluso en las especies que presentan determinación ambiental del sexo (ESD). En la mayoría de especies de vertebrados la determinación del sexo depende del genotipo del cigoto recién formado, por lo que se habla de determinación genotípica (y no genética) del sexo (GSD). En otras, la determinación del sexo depende de las condiciones ambientales experimentadas durante el desarrollo temprano (ESD).
- **Diferenciación sexual.** Proceso mediante el cual una gónada formada, aunque sexualmente indiferenciada, se desarrolla en ovario o testículo según la información genética del cigoto, la influencia del ambiente o ambas. La diferenciación sexual da el *sexo gonadal* o *fenotípico*.
- **Falso hermafroditismo.** Llamado erróneamente también *hermafroditismo juvenil*, es el nombre con el que a veces se denomina la diferenciación sexual de especies gonocoristas indiferenciadas.
- **Gametogénesis.** Proceso mediante el cual se forman, por medio de un tipo especial de división celular de las células germinales llamado meiosis, los gametos masculinos (espermatogénesis) o femeninos (oogénesis).
- **Ginogénesis.** Tipo especial de *partenogénesis* en el que el huevo es activado por la penetración de esperma que, sin embargo, no contribuye con su dotación cromosómica a la del cigoto. Se conoce también con el término de pseudogamia. Muy poco frecuente en vertebrados; presente sólo en algunas especies de peces y reptiles.
- **Gonadogénesis.** Literalmente, formación de las gónadas. Caso particular de la organogénesis que concierne a las gónadas. Término con significados variados pero que debe incluir a la *determinación y diferenciación sexual*. A veces incluye también la *maduración sexual*.
- **Gonocorismo.** El tipo de reproducción sexual mayoritario en los vertebrados. Existencia de sexos separados. Cada individuo funciona sólo como macho o como hembra.



- **Hermafroditismo.** Tipo de reproducción sexual en el que para la mayoría de los individuos de una especie la forma normal de reproducirse consiste en producir ambos tipos de gametos, ya sea de forma secuencial o simultánea. Aunque es un tipo de reproducción muy común en las plantas y los invertebrados, en los vertebrados está presente únicamente en los peces.
- **Hermafroditismo juvenil.** Véase *falso hermafroditismo*.
- **Heterocromosomas.** Cromosomas que son distintos según el sexo que los posea. Término equivalente a cromosomas sexuales. En mamíferos, los cromosomas sexuales son siempre heteromorfos y de ahí el nombre de heterocromosomas. En los peces, sin embargo, hay muchas especies que poseen heterocromosomas, aunque lo normal es que sean *homomorfos*.
- **Híbridoogénesis.** Tipo especial de partenogénesis en el que dos especies se aparean dando lugar a híbridos fértiles. Durante la ovogénesis la hembra elimina uno de los dos genomas, que se recupera durante la fertilización.
- **Intersexo.** Animal que contiene testículos y ovarios o que contiene una gónada con células germinales masculinas y femeninas, ya sean segregadas espacialmente o mezcladas. Todos los hermafroditas son intersexos, pero no todos los intersexos son hermafroditas. De hecho, aunque esta definición sirve para un hermafrodita, este término se aplica normalmente a especies gonocoristas para definir a aquellos animales que por poseer las características citadas se apartan de lo habitual para la especie dada, o sus gónadas reflejan un periodo muy concreto del desarrollo. Muchos intersexos son resultado de la contaminación química de las aguas.
- **Maduración sexual.** Proceso fisiológico controlado por el cerebro que hace que gónadas sexualmente diferenciadas que contienen células germinales en los estadios iniciales o intermedios de la meiosis se conviertan, a través de la gametogénesis, en gónadas que producen gametos.
- **Monosexo.** Población en la que todos los individuos son del mismo sexo.



- **Neomacho.** Macho fenotípico obtenido por la masculinización de una hembra genotípica. En especies cuyo sexo homogamético es el femenino, los neomachos producen esperma que cuando se utiliza para fertilizar a huevos de hembras normales genera poblaciones monosexo (todo hembras).
- **Partenogénesis.** Desarrollo de un organismo exclusivamente a partir de la información genética de la madre. En este modo de reproducción una hembra genera progenie a través de cigotos provenientes de huevos que, mediante distintos mecanismos, mantienen la condición diploide. En los partenogénéticos el desarrollo del cigoto puede tener lugar sin necesidad de fertilización.
- **Proporción de sexos («Sex ratio»).** Número de machos y de hembras en una población. Un sex ratio de, por ejemplo, 64:25, significa que de 89 individuos 64 son machos y 25 son hembras. Los ratios pueden expresarse también como fracciones, como $64/25$ (machos/hembras), $64/89$ (machos/total), pero puesto que no es cómodo trabajar con fracciones, las anteriores pueden expresarse como 2,56 y 0,71, respectivamente. Los porcentajes, 71,9% machos en el ejemplo anterior, son también un tipo de ratio. El sex ratio primario se obtiene una vez formado el cigoto tras la fertilización. Puede estimarse sólo en algunas especies de sistema genético monofactorial. El sex ratio secundario se da en el momento de la eclosión, el terciario es el de los adultos, una vez la diferenciación sexual ha finalizado, y el operacional es el de las poblaciones adultas que se reproducen.
- **Proterándrica.** Especie hermafrodita en la que los individuos primero actúan como machos, produciendo esperma, y después, tras el cambio de sexo, actúan como hembras, produciendo huevos.
- **Proterogínea.** Especie hermafrodita en la que los individuos primero actúan como hembras, produciendo huevos, y después, tras el cambio de sexo, actúan como machos, produciendo esperma.
- **Sexo genotípico.** Llamado también sexo genético. Sexo que viene dado por el genotipo de un individuo, establecido tras la fertilización y la formación del cigoto. Se establece mediante la determinación sexual. Excepto en algunas especies con un sistema monofactorial simple de determinación del sexo o con marcadores moleculares bien definidos, el sexo genotípico normalmente no puede conocerse.

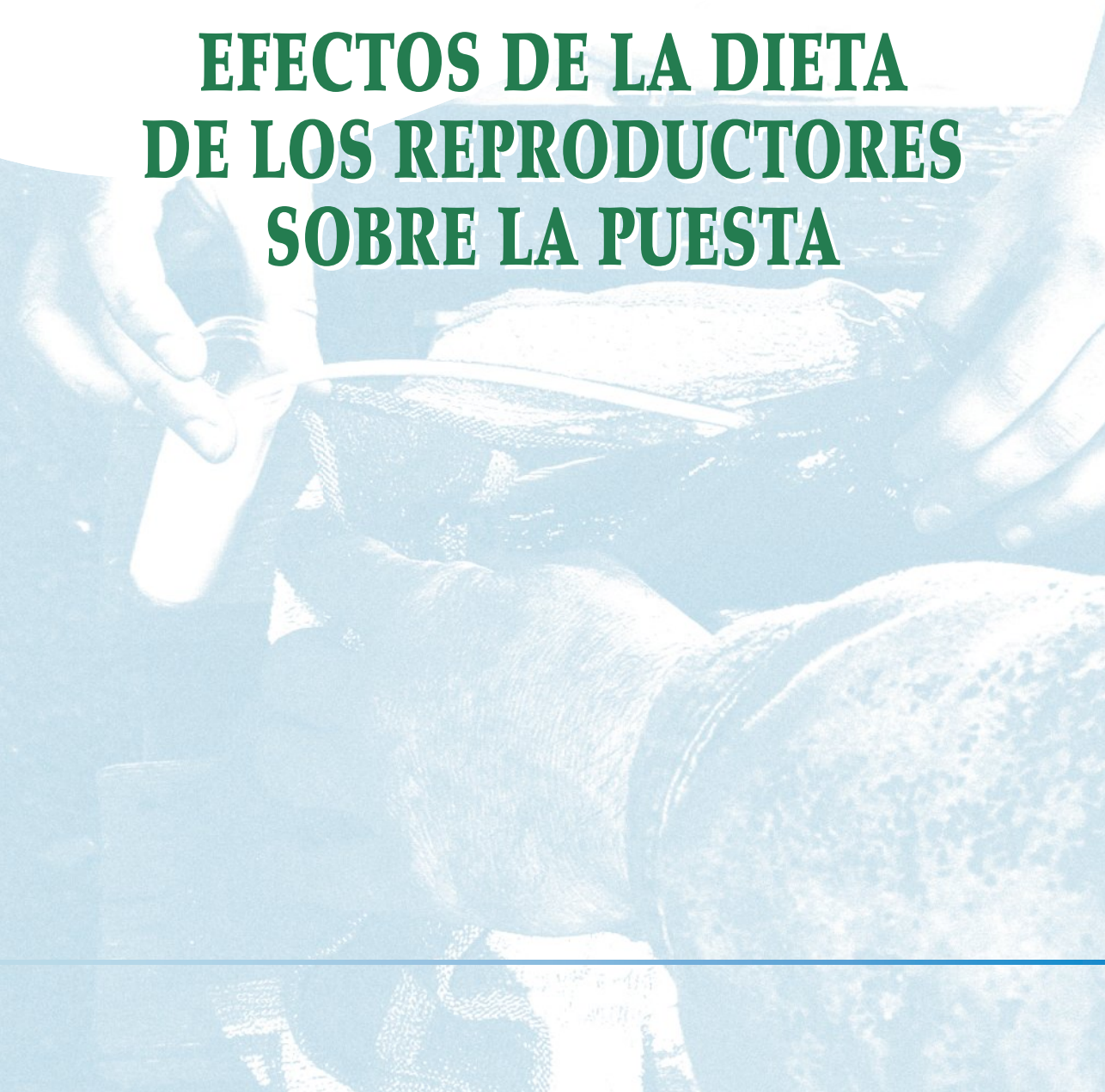


En especies con determinación del sexo ambiental, sin embargo, el sexo genotípico como tal no existe, puesto que el sexo del individuo depende de las condiciones ambientales experimentadas durante el desarrollo.

- **Sexo fenotípico.** Llamado también sexo gonadal. Sexo que viene determinado por la naturaleza de las gónadas de un individuo. Aquellos que producen esperma se llaman machos y los que producen huevos hembras. Se establece con la diferenciación sexual, independientemente de que la determinación sexual sea genotípica o ambiental. Debido a la labilidad del proceso de diferenciación sexual de los peces, el sexo fenotípico no tiene que corresponder necesariamente con el sexo genotípico.
- **Sexo homogamético.** En especies cuya determinación sexual se basa en la herencia de factores principales, el sexo que produce sólo un tipo de gametos en cuanto a la presencia de factores determinantes del sexo.
- **Sexo heterogamético.** En especies cuya determinación sexual se basa en la herencia de factores principales, el sexo que produce dos o más tipos de gametos en cuanto a la presencia de factores determinantes del sexo. En especies de determinación sexual multifactorial ambos sexos son heterogaméticos.
- **«Testis-ova».** También llamado «ovotestis». En medicina, se refiere a una gónada verdaderamente hermafrodita, con unas partes conteniendo tejido testicular y otras tejido ovárico. En los peces, este término se ha usado para referirse a machos de especies gonocoristas que por la circunstancia que sea (tratamiento hormonal, alta temperatura, exposición a contaminantes, etc.) en sus testículos se aprecia la presencia de algunas células germinales femeninas, normalmente oocitos previtelogénicos. Los «testis-ova» son un caso particular de intersexos.

5

EFFECTOS DE LA DIETA DE LOS REPRODUCTORES SOBRE LA PUESTA





EFECTOS DE LA DIETA DE LOS REPRODUCTORES SOBRE LA PUESTA

H. Fernández-Palacios y M.S. Izquierdo

Grupo de Investigación
en Acuicultura (ICCM-ULPGC)

Resumen

En muchos peces cultivados, especialmente en aquellas especies nuevas para la acuicultura, el comportamiento reproductor imprevisible y variable es un importante factor limitante para la producción masiva de semilla. Una mejora en la alimentación y nutrición de los reproductores no solo mejora la calidad de huevos y espermatozoides si no también la producción de semilla. Lípidos y ácidos grasos son algunos de los componentes dietéticos que más influyen sobre la reproducción y calidad de las puestas. Los ácidos grasos altamente insaturados de cadena larga (HUFA) en las dietas de reproductores de peces están relacionados con el incremento de la fecundidad, la fertilización y la calidad de los huevos. También la composición proteica de las dietas de los reproductores influye en gran medida en la calidad de la puesta y afecta notablemente la composición del saco vitelino. Así mismo, la elevación de los niveles dietéticos de α -tocoferol ha mostrado que reduce el porcentaje de huevos anormales e incrementa la fecundidad. El ácido ascórbico igualmente juega un papel importante en la reproducción de los peces, como se ha visto principalmente en salmónidos. Otros ingredientes dietéticos como, carbohidratos, triptófano, taurina, nucleótidos y minerales han sido utilizados en dietas para reproductores para mejorar la calidad de las puestas. Así mismo, diferentes componentes dietéticos tales como harinas de pota, calamar o krill son reconocidos



como importantes componentes en dietas para reproductores. Por otra parte, no solo las deficiencias dietéticas afectan la calidad de las puestas sino también el tamaño de la ración. Finalmente, el periodo de alimentación necesario para modificar la calidad de las puestas depende de la duración del período vitelogenético. Así, mientras que en reproductores con periodos vitelogenéticos cortos y puestas continuas es posible mejorar la calidad de la puesta modificando la calidad nutricional incluso durante el periodo de puesta, en peces con periodos largos de vitelogenénesis es necesario alimentar durante varios meses los reproductores con dietas de buena calidad.

Abstract

In many cultured fish species, particularly in those new for aquaculture, unpredictable and variable reproductive performance is an important limiting factor for the successful mass production of juveniles. The improvement in broodstock nutrition and feeding has been shown to greatly enhance not only egg and sperm quality but also seed production. Lipid and fatty acid composition of broodstock diet have been identified as major dietary factors that determine successful reproduction and survival of offspring. In some species, HUFA in broodstock diets increases fecundity, fertilization and egg quality. Protein composition of the broodstock diets has an influence on the spawning quality, regulating the composition of the yolk sac. Therefore, different feed ingredients such as, cuttlefish, squid and krill meals are recognized as valuable components of broodstock diets. Elevation of dietary α -tocopherol levels has been found to reduce the percentage of abnormal eggs and increase fecundity. Ascorbic acid has also been shown to play an important role in salmonid reproduction. Other dietary ingredients such as, carbohydrates, tryptophan, taurine, nucleotides and minerals have been used in fish broodstock diets to improve spawning quality. Besides, not only the dietary deficiencies affect spawning quality, but also food restriction has serious affects on reproduction. In species with continuous spawnings and short vitellogenetic periods, it is possible to improve spawning quality modifying the nutritional quality of the broodstock diets even during the spawning season. In fish with long vitellogenesis, the broodstock need to be fed with high quality diets, several months before the spawning season to be able to improve the spawning quality.



5.1. INTRODUCCIÓN

Aunque hace tiempo que se reconoce la importancia de una adecuada alimentación en la reproducción y calidad de las puestas en los teleósteos (Luquet y Watanabe, 1986), los requerimientos nutritivos de los reproductores sigue siendo una de las áreas menos estudiadas en el campo de la nutrición de los peces. Además, los escasos trabajos de los que se dispone están limitados a unas pocas especies (Brooks *et al.*, 1997; Izquierdo *et al.*, 2001). En gran medida, esto es debido a la necesidad de grandes instalaciones, interiores o exteriores, para mantener grupos numerosos de reproductores y al alto coste tanto para la construcción como para el mantenimiento de las instalaciones requeridas para realizar experimentos de alimentación de larga duración con peces de gran tamaño. Sin embargo, como ocurre en nutrición humana ó en ganadería (Leboulanger, 1977), es obvio que los requerimientos nutricionales de los reproductores se diferencian claramente de los que requieren los animales jóvenes o los adultos fuera de la etapa reproductiva. Es más, como en otros animales, parece evidente que muchos de los problemas y deficiencias que aparecen en las etapas tempranas del desarrollo de huevos y larvas están directamente relacionados con el régimen alimenticio de los reproductores. Así, por ejemplo, los componentes nutricionales de la dieta, la tasa de ingesta ó la duración del periodo de alimentación, afectan directamente la calidad de las puestas como sugieren las investigaciones realizadas en algunas de las principales especies cultivadas: dorada (*Sparus aurata*) (Mourete y Odriozola, 1990; Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 1997, 2005), lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Cerdá *et al.*, 1994 b; Carrillo *et al.*, 1995; Navas *et al.*, 1997), pargo japonés, (*Pagrus major*) (Watanabe *et al.*, 1984 a, b, c, 1985 b, 1991 b), trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Washburn *et al.*, 1990; Choubert y Blanc, 1993; Blom y Dabrowski, 1995; Choubert *et al.*, 1998; Pereira *et al.*, 1998), salmón Atlántico, (*Salmo salar*) (Eskelinen, 1989; Berglund, 1995; Christiansen y Torrisen, 1997), tilapia (*Oreochromis niloticus*) (De Silva y Radampola, 1990; Cumaratunga y Mallika, 1991; Santiago y Reyes, 1993; Gunasekera *et al.*, 1995, 1996 a, b, 1997; Siddiqui *et al.*, 1998), carpa común (*Cyprinus carpio*) (Manissery *et al.*, 2001) o rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Lavens *et al.*, 1999).



5.2. EFECTO DE LOS COMPONENTES DE LA DIETA

Los pioneros trabajos de Watanabe y colaboradores en el año 1984 mostraron que la composición de las dietas para los reproductores del pargo japonés (*Pagrus major*) constituye un factor determinante de la calidad de sus puestas. Investigaciones posteriores indican que son varios los tipos de nutrientes capaces de influir en la reproducción, tales como: los lípidos polares ó no polares (Watanabe *et al.*, 1991a, b), los ácidos grasos esenciales (Harel *et al.*, 1994; Fernández-Palacios *et al.*, 1995; Carillo *et al.*, 1995; Bruce *et al.*, 1999; Mazorra *et al.*, 2003), los carbohidratos (Mangor-Jensen y Birkeland, 1993), las proteínas (Harel *et al.*, 1995; Gunasekera *et al.*, 1996 a, b), la vitamina E (Emata *et al.*, 2000; Fernández-Palacios *et al.*, 2005), el ácido ascórbico (Dabrowski y Blom, 1994; Blom y Dabrowski, 1995), la vitamina A (Furuita *et al.*, 2003 a), los carotenoides (Vasallo-Agius *et al.*, 2001a) ó los nucleótidos (González-Vecino *et al.*, 2004).

5.2.1. Lípidos

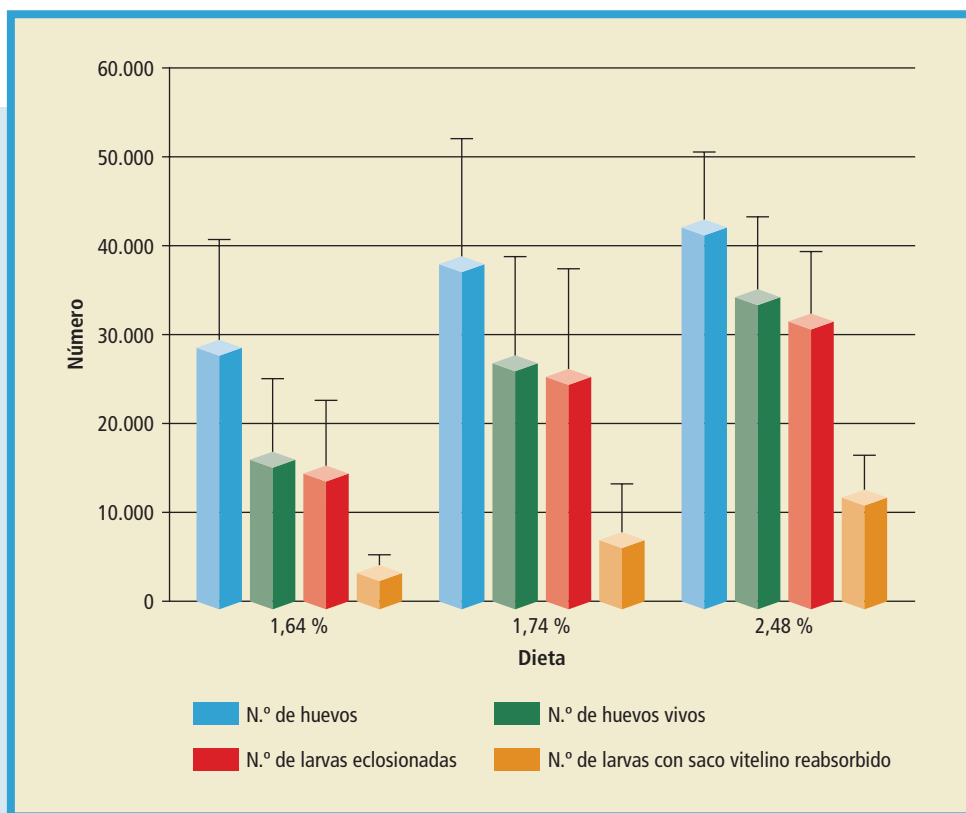
Los lípidos constituyen el componente dietético mejor estudiado en nutrición de reproductores. Trabajos como los de Watanabe *et al.* (1984 a), Mourente *et al.* (1989), Dhert *et al.* (1991), Bruce *et al.* (1993), Fernández-Palacios *et al.* (1995), Navas *et al.* (1997), Rodríguez *et al.* (1998), Lavens *et al.* (1999), Furuita *et al.* (2002, 2003 b), Mazorra *et al.* (2003) y Aijun *et al.* (2005) muestran que el contenido dietético en lípidos totales ó en de ácidos grasos esenciales constituye el factor nutricional que más influye en la calidad de las puestas, especialmente en aquellas especies de puestas continuas que presentan periodos vitelogenéticos cortos y que son capaces de incorporar estos componentes dietéticos en los huevos incluso durante el periodo de puesta (Fernández-Palacios *et al.*, 1995).

La elevación de los niveles de lípidos dietéticos de 12 % a 18 % en las dietas para reproductores del pez conejo (*Siganus guttatus*) produce una notable mejora en su fecundidad, determinada por el número total de huevos producidos (Duray *et al.*, 1994). Aunque este efecto podría ser debido al incremento energético en la dieta, parece estar



estrechamente relacionado con un aumento gradual en los ácidos grasos esenciales de la dieta. De hecho, uno de los factores nutritivos que más afectan la calidad de la puesta es el contenido en ácidos grasos esenciales (AGEs) de la dieta (Watanabe *et al.*, 1984 a, b). En la dorada, Fernández-Palacios *et al.* (1995) indican que la calidad de la puesta, que constituye un factor limitante para la producción masiva de semilla de esta especie, se ve directamente afectada por los niveles de n-3 HUFA (ácidos grasos poliinsaturados con 20 o más átomos de carbono, esenciales para peces marinos) en las dietas de los reproductores (Figura 1). Así, por ejemplo, la fecundidad mejora significativamente con un aumento en los n-3 HUFA dietéticos en la dorada (*Sparus aurata*) (Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 2005) y otros espáridos (Watanabe *et al.*, 1984 a, b, c, 1985 a, b). En otras especies, como el bacalao (*Gadus morhua*), algunos autores (Lie *et al.*, 1993) no han podido demostrar un claro efecto de los ácidos grasos esenciales sobre la fecundidad utilizando dietas comerciales enriquecidas con diferentes tipos de aceites (soja, capellán o sardina). De hecho, ni siquiera la composición del huevo se vio marcadamente afectada cuando los reproductores de esta especie fueron alimentados con dichas dietas durante un largo periodo de tiempo (Lie *et al.*, 1993). Éstos resultados, que parecen contradictorios con los obtenidos en espáridos, podrían ser debidos a unos menores requerimientos de AGEs en los reproductores de bacalao que parecen ser cubiertos por los lípidos residuales presentes en la harina ó el aceite de pescado que contenía la dieta comercial basal a la que se añadieron los distintos tipos de aceites.

Otros ácidos grasos distintos de los n-3 HUFA parecen jugar un papel importante en la producción de huevos en los peces. Así, la presencia de ácido araquidónico (20:4 n-6, ARA) en las dietas para reproductores de halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) incrementa la fecundidad (Bruce *et al.*, 1999). También en el lenguado del Pacífico (*Paralichthys olivaceus*) el incremento dietético de ARA de 0,1 a 0,6 % (peso seco) mejora la fecundidad, mientras que elevaciones hasta el 1,2 % inhiben esta mejora (Furuita *et al.*, 2003b). Sin embargo, Mazorra *et al.* (2003) no encuentran diferencias en la fecundidad de reproductores de halibut alimentados con una dieta conteniendo aceite orbital de atún, muy rico en ARA y ácido docosahexaenoico (22:6

**FIGURA 1.**

Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de reproductores de dorada (*Sparus aurata*) alimentados con dietas conteniendo cantidades crecientes de n-3 HUFA.

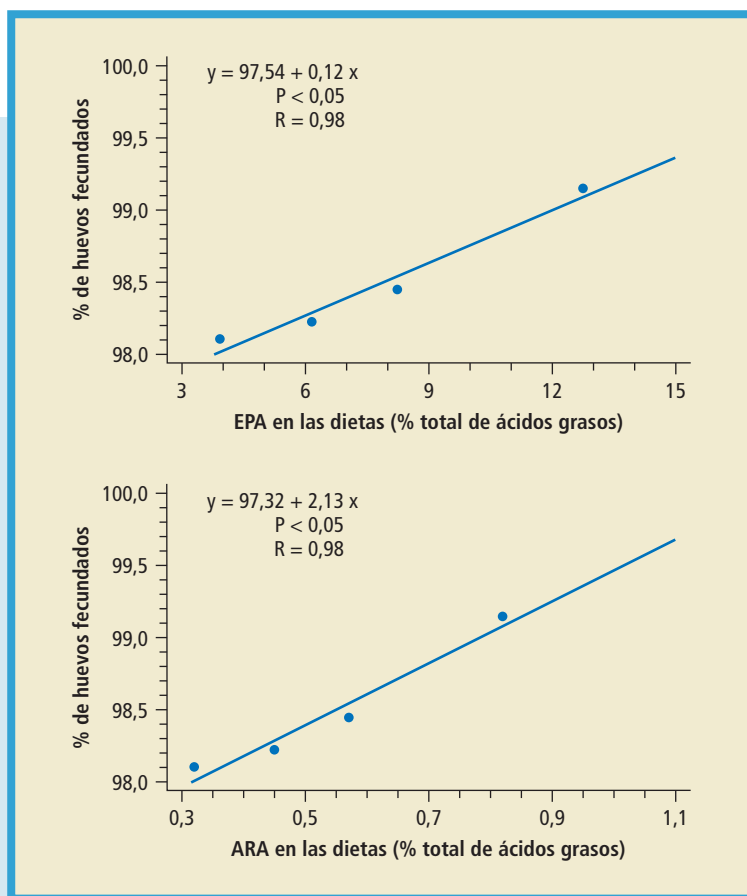
n-3, DHA) y otra dieta basada en harina de krill. Aunque la dieta aceite orbital de atún tiene un contenido en DHA significativamente mayor que la dieta a base de krill, no aparecen diferencias significativas en su concentración en los huevos, probablemente debido a una acumulación selectiva del DHA independientemente de su nivel dietético. En especies de agua dulce, los ácidos grasos de la serie n-6 parecen jugar también un papel principal en la reproducción. Así, estudios en la reproducción de la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) indican que el número de hembras que ponen, la frecuencia de las puestas, el número de larvas obtenido por cada puesta y la producción total de



larvas tras 24 semanas, es mucho mayor en peces alimentados con una dieta basal complementada con aceite de soja, con alto contenido en ácidos grasos de la serie n-6 esenciales para estas especies de peces (Watanabe, 1982), que cuando la dieta se complementa con aceite de hígado de bacalao, rico en ácidos grasos de la serie n-3 (Santiago y Reyes, 1993). Sin embargo, los reproductores alimentados con aceite de hígado de bacalao mostraron una mayor ganancia de peso (Santiago y Reyes, 1993). Pero no solo el contenido total en ácidos grasos de la serie n-6, sino su proporción con respecto a los de la serie n-3 parece ser importante para la reproducción en los peces de agua dulce. Así, por ejemplo, Meinelt *et al.* (1999) señalan el incremento de la tasa de fecundación en puestas del pez cebra (*Danio rerio*) cuando la relación n-3/n-6 disminuye en la dieta de los reproductores. En otra de estas especies la catla (*Catla catla*) se ha demostrado que es esencial complementar las dietas de reproductores con ácidos grasos de ambas series para completar la maduración gonadal y obtener una buena calidad de puesta (Nandi *et al.*, 2001).

En general, los n-3 HUFA parecen ser determinantes en la tasa de fecundación o fertilización de los huevos (Fernández-Palacios *et al.*, 1995; Izquierdo *et al.*, 2001). En dorada (*Sparus aurata*), el porcentaje de fecundación es menor en una dieta deficiente en n-3 HUFA (Rodríguez *et al.*, 1998). Esta reducción en la tasa de fecundación puede ser debida, al menos en parte, a una menor calidad del esperma (Watanabe *et al.*, 1984 d). Así, Vassallo-Agius *et al.* (2001c) encuentran una reducción en la motilidad de los espermatozoides de machos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con una dieta deficiente en n-3 HUFA asociada a una disminución en la tasa de fecundación al fertilizar con este esperma huevos procedentes de hembras alimentadas con una dieta control con n-3 HUFA.

En particular, ciertos ácidos grasos como el ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) y el ARA muestran una marcada correlación positiva con la tasa de fecundación en la dorada, (Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 1997, 2005, Figura 2). Igualmente, el contenido de ARA en dietas para reproductores de halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) se encuentra directamente relacionado con la tasa de fecundación (Mazorra *et al.*, 2003).

**FIGURA 2.**

Relación del EPA y del ARA contenido en dietas experimentales, para reproductores de dorada (*Sparus aurata*), con la tasa de fecundación.

Dado que la composición en ácidos grasos del esperma depende de la composición en ácidos grasos esenciales en la dieta de los reproductores (Leray y Pelletier 1985), en especies como la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Watanabe *et al.*, 1984 d; Labbe *et al.*, 1993) o la lubina, *Dicentrarchus labrax* (Asturiano, 1999), es posible que la motilidad de esperma y a su vez la fecundación se vean afectadas por el nivel dietético de estos ácidos grasos. Así, el contenido de EPA en el



esperma regula la fluidez de las membranas celulares y podría afectar directamente la actividad del espermatozoide y a su vez la tasa de fertilización (Watanabe *et al.*, 1984d). Particularmente en salmónidos, dónde la criopreservación del esperma es empleada frecuentemente, la composición en ácidos grasos del esperma constituye un factor determinante de la integridad de la membrana después de la descongelación. Por otra parte, tanto EPA como ARA son precursores de eicosanoides, entre ellos prostaglandinas (PG) de las series III (Stacey y Goetz 1982), una de las PG mayoritariamente sintetizadas por los peces marinos (Ganga *et al.*, 2005), y II (Bell *et al.*, 1994), respectivamente. Puesto que estos ácidos grasos regulan la producción de eicosanoides, están indirectamente implicados en numerosos procesos reproductores (More, 1985), incluyendo la producción de hormonas esteroideas, el desarrollo gonadal y la ovulación. Los ovarios de los peces tienen una alta capacidad de generar eicosanoides, entre ellos, las prostaglandinas E (PGEs) liberadas por la acción de las ciclooxigenasas, y los leucotrienos LTB₄ y LTB₅, liberados por la acción de las lipooxigenasas (Knight *et al.*, 1995). Los inhibidores de esta última enzima reducen la maduración de los oocitos en lubina (*Dicentrarchus labrax*) inducida por la gonadotrofina (Asturiano, 1999), sugiriendo que los productos derivados de la acción de las lipooxigenasas también pueden estar involucrados en la maduración de los oocitos. Este hecho se ha demostrado en los mamíferos dónde algunos leucotrienos (LTB₄) mejoran la acción esteroidogénica de la hormona luteinizante (LH) (Sullivan y Cooke, 1985). «In vitro» el ARA, pero no el EPA ni el DHA, estimula la liberación de testosterona en los testículos del carpín (*Carassius auratus*) a través de su conversión en prostaglandina PGE₂ (Wade *et al.*, 1994). Por el contrario, el EPA o el DHA bloquearon la acción esteroidogénica del ARA y de la PGE₂. Así, ambos ácidos grasos, ARA y EPA modulan la esteroidogénesis en los testículos del carpín (Wade *et al.*, 1994). Por ello, una deficiencia o un desequilibrio de los AGEs en la dieta de los reproductores puede ocasionar una cierta inhibición de la esteroidogénesis que retrase la espermiación, y como consecuencia reduzca las tasas de fecundación. Es más, también se conocen las prostaglandinas como importantes feromonas en algunos teleósteos (Mustafa y Srivastava, 1989; Sorensen y Goetz, 1993; Rosenblum *et al.*, 1995), estimulando



el comportamiento sexual masculino y sincronizando las puestas de la hembra y el macho, afectando directamente así al éxito de la fecundación (Sorensen *et al.*, 1988).

Varios autores (Sandnes *et al.*, 1984; Craik 1985; Harel *et al.*, 1992; Parrish *et al.*, 1994; Bell *et al.*, 1997; Almansa *et al.*, 1999) han sugerido que la composición química de los huevos de peces está relacionada con la calidad de las puestas, ya que la composición del huevo debe satisfacer las demandas nutritivas del embrión para su desarrollo y crecimiento. Fernández-Palacios *et al.* (1995) señalan que la composición en ácidos grasos de los huevos de dorada (*Sparus aurata*) está directamente afectada por el contenido en n-3 HUFA de la dieta de los reproductores. Los ácidos grasos de la serie n-3 y los n-3 HUFA contenidos en los huevos de dorada se incrementan cuando se incrementan los n-3 HUFA de la dieta (Figura 3), debido principalmente al aumento de 18:3n-3 (ácido linolénico), 18:4n-3 (ácido estearidónico) y EPA.

Sin embargo, un alto contenido de n-3 HUFA en el huevo no siempre está asociado a una buena calidad de puesta (Izquierdo *et al.*, 2001). Además, la composición en ácidos grasos de los lípidos de los huevos de peces no sólo es determinada por la dieta de los reproductores, si no que también esta relacionada con la especie y con diferentes lotes de la misma especie (Pickova *et al.*, 1997), o con las condiciones ambientales en las que se produce la gametogénesis (Dantagnan *et al.*, 2007). En trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), alimentada con una dieta deficiente en ácidos grasos de la serie n-3 durante los tres últimos meses de la vitelogénesis, se produce sólo una ligera reducción del contenido de DHA en el huevo, mientras que la concentración de EPA disminuye drásticamente en un 50 % (Fremont *et al.*, 1984). Esta retención selectiva de DHA también se ha encontrado durante la embriogénesis (Izquierdo, 1996) y durante la inanición en los estadios larvarios (Tandler *et al.*, 1989) denotando la importancia de este ácido graso para el desarrollo del embrión y de la larva.

La viabilidad de los huevos también se ve claramente afectada por el contenido en n-3 HUFA de las dietas de los reproductores. Fernández-Palacios *et al.* (1995, 2005) indican que el porcentaje de huevos viables, definidos como huevos morfológicamente normales, aumenta con la

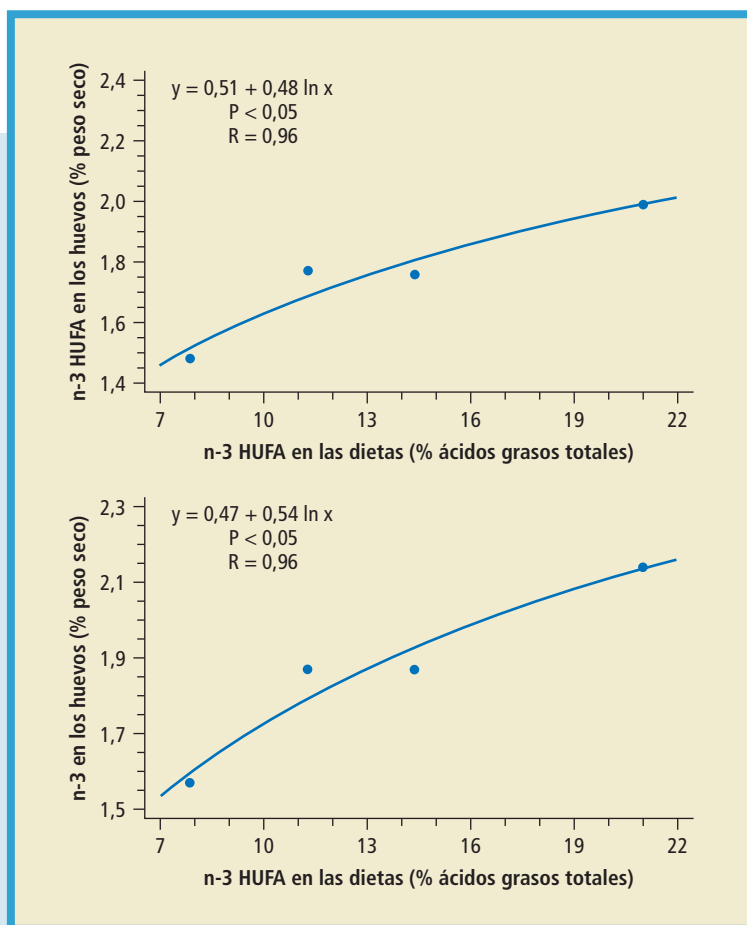


FIGURA 3.

Relación entre los n-3 HUFA dietéticos y los niveles de ácidos grasos de las series n-3 y n-3 HUFA en los huevos.

elevación de los niveles de n-3 HUFA en las dietas de los reproductores y con la incorporación de estos ácidos grasos en los huevos (Figura 4), lo que indica la importancia de estos ácidos grasos esenciales para el desarrollo normal de huevos y embriones de dorada (*Sparus aurata*). Resultados similares para esta especie han sido descritos por Domarco (2001), utilizando dos dietas comerciales y dos dietas húmedas (calamar-gambas y calamar-caballa) encontró que el incremento de los niveles



de n-3 HUFA en los huevos implicaba un aumento en el porcentaje de huevos viables, independientemente del ingrediente utilizado.

Así, por ejemplo, la alimentación de reproductores de dorada (*Sparus aurata*) con dietas deficientes en AGEs ocasiona un aumento del número de gotas de grasa en el huevo (Fernández-Palacios *et al.*, 1997, 2005) como también se ha señalado en el pargo japonés, *Pagrus major* (Watanabe *et al.*, 1984 a). Makino *et al.* (1999) observaron que era frecuente en las puestas del robalo japonés (*Lateolabrax japonicus*) la

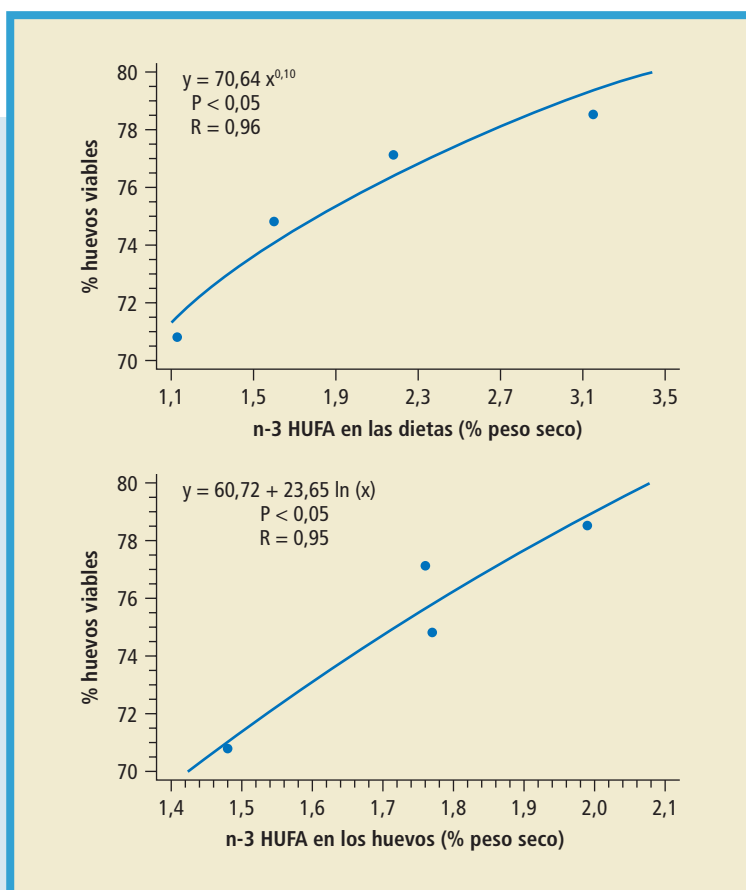


FIGURA 4.

Relación entre el porcentaje de huevos viables con el nivel dietético de n-3 HUFA y el contenido en n-3 HUFA de los huevos.



existencia de huevos con más de una gota de grasa y siguiendo su desarrollo comprobaron que la fusión en una sola gota lipídica, en la mayoría de las ocasiones, ocurría durante la formación de las cápsulas ópticas en el embrión en desarrollo, teniendo estos huevos altos porcentajes de eclosión y de larvas normales.

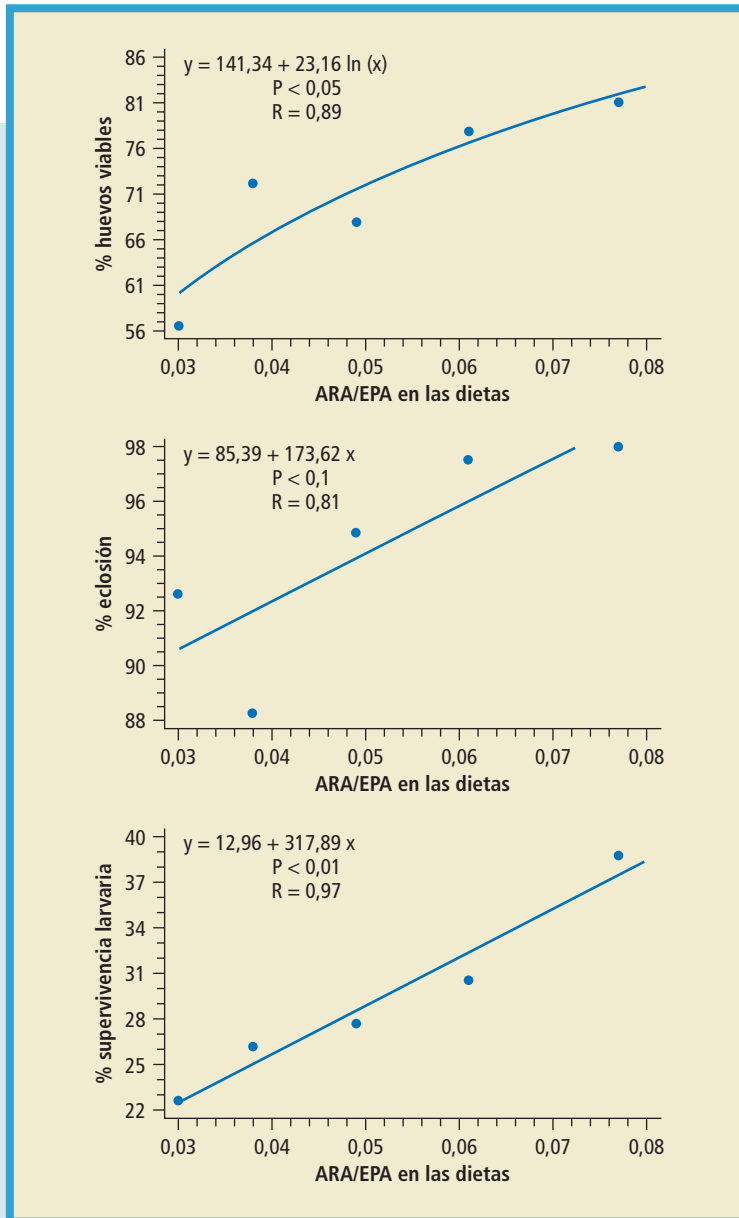
Así mismo, la mejora en la viabilidad de la puesta en lubina (*Dicentrarchus labrax*) alimentada con una dieta enriquecida con aceite de pescado de alta calidad ha sido asociada con un alto contenido en ácidos grasos de la serie n-3 (Navas *et al.*, 1997). De manera semejante, la viabilidad de los huevos del cherne americano (*Morone chrysops*), expresada en términos de altos porcentajes de eclosión, están asociados a un mayor contenido de n-3 HUFA en las dietas y en los huevos (Lane y Kholer, 2006).

Por otra parte, la comparación entre huevos de bacalao (*Gadus morhua*) de agua salobre y agua marina muestran que el contenido en ARA y la relación DHA/EPA de la fracción polar de los lípidos de los huevos están correlacionados positivamente con la simetría del huevo y su viabilidad (Pickova *et al.*, 1997). Estos ácidos grasos, en algunas especies, constituyen importantes fuentes de energía durante el desarrollo embrionario temprano (Tocher *et al.*, 1985 a, b; Falk-Petersen *et al.* 1986, 1989; Rainuzzo, 1993; Sargent, 1995). Además, tienen diferentes funciones en los peces, tales como su importante papel estructural como componentes de los fosfolípidos en las biomembranas del pez, regulando la fluidez de las mismas y su correcto funcionamiento fisiológico (Bell *et al.*, 1986, 1997; Takeuchi, 1997; Sargent, 1995; Sargent *et al.*, 1999). En concreto, la estructura particular del DHA confiere a este ácido graso unas características físico-químicas muy particulares que le permiten jugar un papel esencial en diversos aspectos del metabolismo en los peces. Su incorporación a las membranas en los distintos tipos celulares del organismo regula la integridad y funcionamiento de las mismas, siendo un componente principal de los fosfoglicéridos, particularmente de las fosfatidiletanolaminas y fosfatidilcolinas. Este ácido graso es especialmente importante en el tejido neural, retina, nervio óptico y estructuras relacionadas con los órganos de los sentidos (Sargent *et al.*, 1993, Benítez *et al.*, 2007). Además puede ser un sustrato adecuado para las lipoxigenasas que



sintetizan eicosanoides (Asturiano, 1999) que regulan muchos aspectos del metabolismo de los peces incluidos la esteroidogénesis (Ganga *et al.*, 2006). En muchas especies marinas el DHA ha demostrado ser más determinante que el EPA como ácido graso esencial (Watanabe *et al.*, 1989; Watanabe, 1993). Puesto que ambos ácidos grasos compiten entre ellos por las enzimas que regulan la síntesis de eicosanoides, fosfoglicéridos, etc., la relación entre ambos en la dieta (EPA/DHA) será determinante para las distintas funciones fisiológicas que regulan, incluida la reproducción.

Algunos autores también han señalado la importancia de la relación ARA/EPA en el desarrollo larvario (Sargent *et al.*, 1999; Koven *et al.*, 2001). Esta relación es además importante para muchas funciones fisiológicas que dependen del estado evolutivo de la especie y de sus requerimientos (Pickova *et al.*, 2007). Bell *et al.* (1997), Bruce *et al.* (1999) y Omnes *et al.* (2004) han sugerido la importancia de las relaciones ARA/EPA y EPA/DHA contenidas en dietas para reproductores para mejorar la calidad de las puestas. Estos tres ácidos grasos ARA, EPA y DHA son importantes para el control de la ovulación (Mustafa y Srivastava, 1989) y están probablemente implicados en la embriogénesis, desarrollo del sistema inmune, eclosión y desarrollo larvario inicial. El ARA es un importante precursor de eicosanoides en las células de los peces (Bell y Sargent, 2003) en competencia con el EPA que parece ejercer una influencia moduladora sobre la producción de eicosanoides derivados del ARA. Puesto que estos eicosanoides juegan un papel fundamental en la regulación del desarrollo embrionario y larvario, del sistema inmune ó en la osmoregulación, entre otras muchas funciones, pero presentan diferente actividad fisiológica según sean derivados del EPA ó el ARA, la relación dietaria, y por lo tanto tisular, ARA/EPA constituye un factor nutricional crítico en dietas para larvas y reproductores. Así, el incremento de la relación dietética ARA/EPA mejora los porcentajes de huevos viables, eclosión y supervivencia larvaria en la dorada (*Sparus aurata*) (Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 2005, Figura 5), de eclosión en lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Navas *et al.*, 2001) y de huevos viables y eclosión en puestas del halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Mazorra *et al.*, 2003). Este último estudio sugiere tasas de 3-4:1 EPA/ARA como más adecuadas en las

**FIGURA 5.**

Relación entre el nivel dietético de la proporción ARA/EPA y los porcentajes de huevos viables, eclosión y supervivencia larvaria.



dietas para reproductores de esta especie. Sin embargo, un exceso en ARA o en su relación con el EPA puede ocasionar efectos perjudiciales para la reproducción. En dorada (*Sparus aurata*), Fernández-Palacios *et al.* (2005) encuentran que un nivel dietario de ARA del 0,38 % mejora la calidad de las puestas, mientras que niveles superiores influyen negativamente en dicha calidad, encontrando que la relación EPA/ARA mas adecuada para la mejora de la calidad de las puestas es de 13:1. También Furuita *et al.* (2003 b) señalan el efecto negativo de altos niveles de ARA en dietas para lenguado del Pacífico (*Paralichthys olivaceus*) en la calidad de las puestas, posiblemente debido a un potencial efecto inhibitor en la bioconversión del EPA. Por otra parte, de manera general, Sargent *et al.* (1999) indican que la relación EPA/ARA óptima en alimentos para larvas de lubina es de 1:1, mientras que para rodaballo ó halibut son de 10:1 o mayores.

Pocos estudios han podido demostrar la mejora de calidad de la semilla a través de la dieta de los reproductores. En pez conejo (*Signatus guttatus*) se ha comprobado que es posible mejorar la supervivencia de las larvas de 14 días de edad incrementando los lípidos dietéticos en la dieta de los progenitores (Duray *et al.*, 1994). También la elevación de los niveles dietéticos de n-3 HUFA (particularmente del DHA) en las dietas de reproductores de perca de río (*Perca fluviatilis*) mejora significativamente el peso de las larvas producidas y su resistencia al shock osmótico (Aby-Ayad *et al.*, 1997). De una manera similar, el aumento en los niveles de n-3 HUFA en las dietas de reproductores de dorada mejora significativamente la supervivencia de larvas con saco vitelino reabsorbido. Es más, el crecimiento, supervivencia e inflación de la vejiga natatoria en larvas de dorada mejoran cuando se usa aceite de pescado, en lugar de aceite de soja, en las dietas para los reproductores (Tandler *et al.*, 1995). En esta misma especie, la alimentación de los progenitores con niveles altos lípidos ocasiona un incremento en el peso y la talla de larvas de 28 días de edad (Bueno, 2001, Figura 6).

No solamente las deficiencias dietéticas de AGEs causan efectos negativos en la calidad de las puestas, sino que, en ciertas condiciones, su exceso también podría tener un efecto negativo sobre la misma. Por ejemplo, niveles altos de n-3 HUFA en la dieta de los reproductores de dorada acompañados de un aumento de su concentración en el



huevo, ocasionan una disminución en la cantidad total de huevos producidos (Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 2005). Similares resultados, en cuanto a la producción de semilla, son encontrados en el espada, *Xiphophorus helleri*, por Ling *et al.* (2006). Li *et al.* (2005) encuentran en el crescent sweetlips (*Plectorhynchus cinctus*) que dietas tanto con exceso o deficiencia de n-3 HUFA, tienen efectos negativos en la calidad de huevos y larvas. Furuita *et al.* (2002) señalan en el lenguado del Pacífico, *Paralichthys olivaceus*, una disminución de los porcentajes de huevos flotantes, eclosión y de larvas normales al aumentar los n-3 HUFA dietéticos de 2,1 a 6,2 %. Esta inhibición en la producción de huevos podría ser debida a la acción directa de los niveles tisulares de n-3 HUFA en el eje endocrino cerebro-pituitario-gonadal. Por ejemplo, se ha encontrado que los ácidos grasos EPA y DHA reducen «in vitro» la acción esteroidogénica de la gonadotrofina en el ovario de los teleósteos (Mercure y Van Der Kraak, 1995). Esto también ocurre en mamíferos en los que un alto nivel de ácidos grasos en la dieta retrasa la aparición de la pubertad (Zhang *et al.*, 1992). Aunque este efecto negativo de un exceso de n-3 HUFA podría estar relacionado

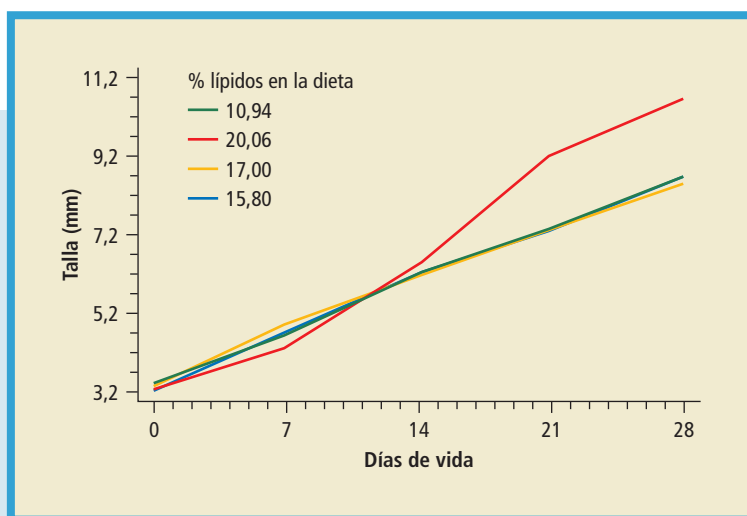


FIGURA 6.

Crecimiento de larvas de dorada procedentes de reproductores alimentados con dietas con diferentes niveles de lípidos.



con una carencia de antioxidantes en la dieta (Fernández-Palacios *et al.*, 2005).

En general, los requerimientos en ácidos grasos esenciales para reproductores de espáridos varían entre un 1,5 % y un 2,5 % de n -3 HUFA en la dieta (Watanabe *et al.*, 1984 a, b, c, 1985 a, b; Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 2005), siendo más altos que los determinados para juveniles que varían entre el 0,5 % y el 0,8 % de n -3 HUFA en la dieta (Izquierdo, 1996). Estos valores son también más altos que los determinados para salmónidos, aproximadamente alrededor de 1 % de n -3 HUFA (Watanabe, 1990).

5.2.2. Proteínas

La maduración ovárica en los peces implica cambios bioquímicos considerables que resultan en una masiva incorporación de lípidos y proteínas en los oocitos (Frémont *et al.*, 1984) durante la vitelogénesis. En la dorada, que desova continuamente durante 3-4 meses, estos componentes bioquímicos deben proporcionarse continuamente a través de dietas de alta calidad nutritiva.

Las proteínas constituyen el componente más abundante de los nutrientes contenidos en los huevos de peces (Watanabe y Kiron, 1994). Además, son la principal fuente de energía durante el desarrollo embrionario de muchas especies de teleósteos (Fynh y Serigstad, 1987; Rønnestad *et al.*, 1992; Sivaloganathan *et al.*, 1998). Las proteínas tienen un papel particularmente importante en la fecundación y desarrollo normal del embrión (Fynh y Serigstad, 1987; Srivastava y Brown, 1992; Srivastava *et al.*, 1995). Por ejemplo, las proteínas que envuelven el vítelo desempeñan un papel muy importante durante la fecundación (Hart, 1990). La vitelogenina es la principal proteína precursora de vitelo en los teleósteos y su composición en aminoácidos se caracteriza por altos contenidos en alanina, ácido glutámico y leucina y bajos contenidos en serina. Por otra parte, la composición en aminoácidos de las proteínas que envuelven el vítelo en los huevos de la dorada está caracterizada por un alto contenido en prolina y en ácido glutámico y un relativamente bajo contenido en cistina (Hyllner *et al.*, 1995) (Cuadro 1). Los aminoácidos libres también aparecen en altas cantidades en los huevos de peces pelágicos, contabilizándose por



encima de 43 nmol por huevo en dorada (*Sparus aurata*), incluyen-
do leucina, lisina, valina, isoleucina, alanina y serina como principales
aminoácidos (Rønnestad, 1992).

CUADRO 1.

Composición en aminoácidos del vitelo y de las fracciones proteicas del mismo,
en huevos de dorada.

FRACCIONES PROTEICAS DEL VITELO					
AMINOÁCIDO	VITelo	75 kDa	50 kDa	48 kDa	44 kDa
A. ASPARTICO	7,5	8,8	7,8	10,0	9,0
SERINA	8,5	8,8	7,5	8,8	8,3
A. GLUTÁMICO	12,9	13,3	13,0	9,8	11,8
PROLINA	13,7	15,2	10,0	7,9	8,0
GLICINA	6,0	7,3	7,7	7,0	7,8
ALANINA	6,5	5,1	6,9	8,3	6,2
ARGININA	3,8	4,1	4,9	4,3	4,5
HISTIDINA	1,8	1,9	1,8	2,8	2,2
ISOLEUCINA	2,6	3,2	3,5	3,6	4,1
LEUCINA	5,9	5,6	7,6	8,1	8,5
LISINA	4,5	3,4	4,4	4,9	3,0
METIONINA	1,0	0,8	1,5	0,9	1,0
FENILALANINA	3,3	3,4	2,7	4,3	4,7
TREONINA	6,0	5,6	6,3	6,0	6,0
VALINA	7,4	7,7	7,6	7,7	8,7
CISTEINA	2,9	1,6	1,9	1,3	2,3
TIROSINA	5,6	4,0	4,9	4,4	3,9

* Los valores están expresados en % de moles del total de aminoácidos. El triptófano no fue determinado.

Por ello, no es de extrañar que la composición proteica de la dieta de los reproductores influya en la calidad de la puesta regulando la síntesis y selección de los componentes del saco vitelino. Así, en la dorada una dieta para reproductores bien equilibrada en aminoácidos esenciales mejora la síntesis de vitelogenina (Tandler *et al.*, 1995). Estas proteínas constituyen una importante fuente de aminoácidos y de reserva energética utilizadas durante la intensa actividad biosintética en las etapas tempranas de la embriogénesis (Metcoff, 1986). Por ello, el correcto desarrollo embriona-



rio en los peces depende en gran medida del contenido de aminoácidos presentes en el huevo (Fynh y Serigstad, 1987; Fynh, 1989). En estudios llevados a cabo en reproductores del pargo japonés (*Pagrus major*) se ha estimado que el nivel óptimo de proteínas en dietas, conteniendo harina de pescado como principal fuente de energía, está alrededor del 45 % (Watanabe *et al.*, 1984a, b, d, e). Los reproductores alimentados por debajo de ese nivel producen aproximadamente un 30 % menos de huevos. La fecundidad también se ve afectada por las proteínas dietéticas en los reproductores de lubina (*Dicentrarchus labrax*), que al ser alimentados con altos porcentajes de proteínas muestran una fecundidad 1,5 veces mayor que cuando la dieta es baja en proteínas (Cerdá *et al.*, 1994 b). Es más, la reducción de los niveles de proteína dietética del 51 % al 34 % junto con un aumento de los niveles de hidratos de carbono del 10 % al 32 % produce un incremento en las deformidades larvarias en la lubina (Cerdá *et al.*, 1994 b). Durante la puesta de los reproductores de lubina, estas dietas bajas en proteína alteran la secreción de GnRH (Kah *et al.*, 1994) y de gonadotrofina GtH II, que juegan un importante papel regulador de la maduración del oocito y la ovulación (Navas *et al.*, 1996). La fecundidad de los reproductores también se ve afectada por el nivel de proteína dietética en otras especies como tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Al Hafedh *et al.*, 1999; El-Sayed *et al.*, 2003) ó espada (*Xiphophorus helleri*) (Chong *et al.* 2004). Además, en esta última especie, la elevación de los niveles de proteína incrementa la producción total de larvas (Ling *et al.*, 2006). En concordancia con estos resultados, la fecundidad de los reproductores del labeo roho (*Labeo rohita*) incrementa con la elevación de los niveles de proteína dietaria de 20 a 25 y 30 %, mientras que su incremento hasta el 35 ó 40 % reduce la fecundidad (Khan *et al.*, 2005). Los niveles óptimos de proteína dietética en las dietas para obtener la máxima fecundidad en reproductores del pez gato *Mystus nemurus* se sitúan entorno al 35 % de proteína (Abidin *et al.*, 2006). En el caso del rodaballo (*Scophthalmus maximus*), parece ser necesario elevar los contenidos de proteína y lípidos por encima de 45 y 10 %, respectivamente, con contenidos de 2 % de HUFA para obtener las mayores fecundidades (Aijun *et al.*, 2005). Así, vemos que los requerimientos de proteína encontrados en la bibliografía para las distintas especies estudiadas varían entre 30 y 45 % (Cuadro 2).



CUADRO 2.

Requerimientos de proteína en dietas para reproductores de diversas especies de peces.

ESPECIE	*REQUERIMIENTO	REFERENCIAS
<i>Pagrus major</i>	45 %	Watanabe <i>et al.</i> (1984a, b, d, e)
<i>Dicentrarchus labrax</i>	>34 %	Cerdá <i>et al.</i> (1994b)
<i>Labeo rohita</i>	30 %	Khan <i>et al.</i> (2005)
<i>Mystus nemurus</i>	35 %	Abidin <i>et al.</i> (2006)
<i>Scophthalmus maximus</i>	45 %	Aijun <i>et al.</i> (2005)

* % Peso seco de la dieta.

Pero no solamente el contenido total de proteínas dietéticas, sino también el tipo de fuente de proteína utilizada en las dietas para reproductores parece ser determinante de la calidad de las puestas. Varios estudios han puesto de manifiesto el efecto beneficioso de la alimentación de los reproductores de espáridos con sepia, calamar o las harinas preparadas de estos cefalópodos (Watanabe *et al.*, 1984 a, b; Mourente *et al.*, 1989; Zohar *et al.*, 1995), sugiriendo que presentan componentes nutritivos esenciales para la reproducción. Por ejemplo, la alimentación de reproductores de pargo japonés (*Pagrus major*) con una dieta a base de harina de sepia, en lugar de harina de pescado, incrementa la producción total de huevos y la viabilidad de los mismos (Watanabe *et al.*, 1984 a, b). Incluso la substitución parcial del 50 % de la harina de pescado por harina de sepia (Watanabe *et al.*, 1984 a, b) mejora la viabilidad de los huevos, aunque sin alterar la tasa de fertilización de los mismos. Mourente *et al.* (1989) relacionaron este efecto beneficioso con el elevado contenido en ácidos grasos esenciales de la sepia, mientras que Watanabe *et al.* (1984 a) sugirieron que el alto valor dietético de la sepia es debido principalmente a algún componente presente en la fracción hidrosoluble de la misma. De una manera similar, la sustitución del 50 % de la harina de pescado por harina de calamar en dietas para el jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*) mejoró los porcentajes de huevos fecundados y eclosión aunque no incrementó el número de huevos producidos por hembra (Vassallo-Agius *et al.*, 2001 b). Emata y Borlongan. (2003) señalan que los porcentajes de eclosión y de supervivencia larvaria mas altos, en puestas del (*Lutjanus argentimaculatus*), corresponden a los reproduc-



tores alimentados con harina y aceite de calamar, en substitución de la harina y aceite de pescado.

Fernández-Palacios *et al.* (1997) realizaron algunas experiencias encaminadas a discernir qué componentes de la harina de calamar son responsables de la mejor calidad nutritiva de esta harina en comparación con la de pescado, una de las principales fuentes de proteína utilizadas para la alimentación de los reproductores de peces. Para ello alimentaron reproductores de dorada (*Sparus aurata*) con cuatro tipos de dietas basadas en harina calamar, harina de pescado, harina de calamar desengrasada con solventes orgánicos y completada con aceite de pescado o harina de pescado desengrasada con solventes orgánicos y completada con aceite de harina de calamar. Los resultados mostraron una mejora significativa en la calidad de las puestas cuando los reproductores eran alimentados con las dietas que contenían harina de calamar ó harina de calamar desengrasada, principalmente en términos de número total de huevos producidos por kg de hembra al día (Figura 7), y porcentajes de huevos viables y fertilizados.

Por tanto, la proteína de la harina de calamar, como componente principal tanto de la harina de calamar como, especialmente, de la harina de calamar desengrasada, parece ser el principal nutriente responsable del alto valor nutritivo de estos ingredientes para los reproductores de distintas especies y la mejora que su inclusión dietética origina en la calidad de las puestas (Fernández-Palacios *et al.*, 1997; Izquierdo *et al.*, 2001). Puesto que los perfiles de aminoácidos fueron muy similares entre las distintas dietas (Cuadro 3), el valor superior de la proteína de calamar frente a la de pescado fue atribuido por dichos autores, al menos en parte, a la mejor digestibilidad que encontraron para la primera fuente de proteínas en comparación con la de la harina de pescado. De hecho, el contenido proteico de los huevos obtenidos de los reproductores alimentados con proteína de calamar fue ligeramente superior al de los alimentados con harina de pescado.

Por otra parte, a pesar de que se había sugerido que el bajo contenido en calcio de las harinas de calamar en comparación con las de pescado podría ser una característica de este ingrediente determinante de su gran valor nutritivo para los reproductores, la adición de calcio a una dieta basada en harina de calamar no afecta la calidad de la

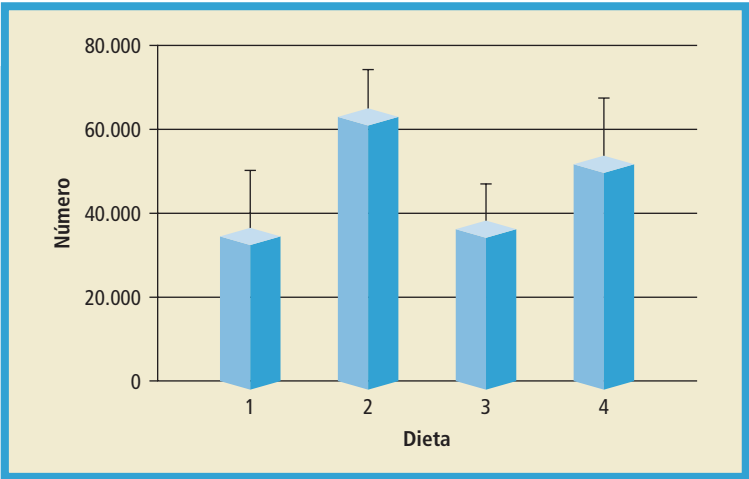


FIGURA 7.

Total de huevos producidos (por kg de hembra y por puesta) por reproductores de dorada (*Sparus aurata*) alimentados dietas basadas en harina de pescado (1 y 3) y harina de calamar (2 y 4).

CUADRO 3.

Requerimientos calculados de aminoácidos para dorada (*Sparus aurata*) y perfiles teóricos de aminoácidos de las dietas experimentales (en g por 100 g de peso seco).

DIETA					
AMINOÁCIDO	REQUERIMIENTO*	1	2	3	4
ARGININA	2,39	3,17	3,23	3,72	3,69
HISTIDINA	1,00	1,84	1,87	1,16	1,15
ISOLEUCINA	2,07	3,64	3,71	2,08	2,07
LEUCINA	2,89	4,66	4,74	4,09	4,06
LISINA	3,02	4,95	4,94	4,11	4,08
METIONINA	1,10	1,62	1,65	1,68	1,67
FENILALANINA	1,39	2,52	2,57	1,89	1,87
TREONINA	2,03	3,23	3,29	2,47	2,45
VALINA	1,50	3,00	3,06	2,06	2,05
CISTÍNA	0,38	0,81	0,83	0,49	0,49
TIROSINA	1,18	1,97	2,01	1,91	1,90

* Requerimientos de aminoácidos esenciales calculados para la dorada (*Sparus aurata*) en base a la composición corporal de la misma, Vergara (1992).



puesta de otro espárido, el pargo japonés (*Pagrus major*) (Watanabe *et al.*, 1991b).

La sustitución de la proteína o la grasa dietética proveniente de la harina de calamar por proteína ó grasa obtenida de la soja en las dietas para dorada (*Sparus aurata*) origina una reducción significativa en los porcentajes de eclosión y de supervivencia al tercer día de vida de las larvas (Zohar *et al.*, 1995). Pero este detrimento en la calidad de las puestas puede ser ocasionado no solo por la reducción en la cantidad de harina de calamar, sino que bien podría deberse a un efecto perjudicial de la harina de soja. Aunque varios autores (Robaina *et al.*, 1995) han señalado el interés de la harina de soja como fuente de proteínas para el engorde de la dorada y este ingrediente es utilizado de forma generalizada en los piensos comerciales, la posible presencia de factores antinutritivos puede limitar su inclusión en altos niveles. Mas aún, un desequilibrio en la relación de ácidos grasos polinsaturados n-3/n-6 junto con la reducción en la disponibilidad del fósforo en las dietas para reproductores basadas en harina de soja podría directamente reducir la calidad de las puestas, pues tanto los ácidos grasos como el fósforo son esenciales para la reproducción de los espáridos (Watanabe *et al.*, 1984a; Watanabe y Kiron, 1995).

5.2.3. Vitaminas

Se reconocen 15 vitaminas establecidas como esenciales para los peces al igual que lo son para vertebrados terrestres (Woodward, 1994). Los requerimientos de vitamina A (retinol), vitamina D (colecalfiferol), vitamina E (tocoferol), vitamina K (menadiona) y vitamina C (ácido ascórbico), han sido determinados sólo para algunas especies de teleósteos (National Research Council, 1993, Cuadro 4) y su efecto sobre la reproducción y la calidad de las puestas ha sido poco estudiado.

La vitamina E actúa como un potente antioxidante natural, previniendo la degeneración peroxidativa de las grasas en las células animales y la consecuente formación de radicales libres (Huber, 1988). Mediante la captura de radicales libres de oxígeno producidos habitualmente por el metabolismo, la vitamina E repara la oxidación de las membranas celulares (Horton *et al.*, 1996). Los radicales de oxígeno, en especial el radical hidroxilo, tienen gran afinidad por los áci-



CUADRO 4.

Requerimientos de vitaminas A, D, E, K y C en las dietas de cinco especies de teleósteos.

ESPECIE					
VITAMINAS	Pez gato	Trucha arcoiris	Salmón del Pacífico	Carpa	Tilapia
A (IU/kg)	1,000-2,000	2,500	2,500	4,000	NE
D (IU/kg)	500	2,400	NE	NE	NE
E (IU/kg)	50	50	50	100	50
K (mg/kg)	N	NE	N	NE	NE
C (mg/kg)	25-50	50	50	N	50

* N: necesaria en las dietas pero en cantidad no determinada; NE: no ensayada.

dos grasos poliinsaturados que forman parte de los fosfolípidos de las membranas celulares. Durante esta unión el radical hidroxilo sustrae un hidrógeno del ácido graso para dar lugar a la formación de un nuevo radical orgánico. Seguidamente este radical orgánico, en busca de una pareja para su electrón, ataca el lípido vecino y da lugar a un nuevo radical, y así sucesivamente, creándose una verdadera reacción en cascada que daña de manera prácticamente irreversible la membrana celular. La vitamina E, que normalmente se encuentra formando parte de las membranas biológicas, es un potente inhibidor de la lipoperoxidación (Coelho, 1991; Chew, 1996). Además, la vitamina E juega un papel fundamental en la reproducción. Así, su deficiencia causa tasas bajas de crecimiento muscular y degeneraciones en los embriones de vertebrados, bajas tasas de eclosión, y degeneración y expulsión de las células germinativas epiteliales de los testículos, esterilidad y descenso en la producción de prostaglandinas por los microsomas de los testículos (Lehninger *et al.*, 1993).

Aunque los efectos negativos de la deficiencia de la vitamina E en la reproducción de otros vertebrados se conocen desde principios del siglo pasado, la importancia de la vitamina E en la dieta para reproductores de peces no se demostró hasta 1990. Deficiencias de esta vitamina en dietas de reproductores de carpa común (*Cyprinus carpio*) y de ayu (*Plecoglossus altivelis*), inhiben la maduración de las gónadas y reducen las tasas de eclosión y de supervivencia larvaria en el ayu (Watanabe, 1990). También en pargo japonés (*Pagrus major*) la ele-



vacación de los niveles dietéticos de vitamina E (por encima de 2.000 mg/kg) en las dietas de los reproductores incrementa la calidad de las puestas aumentando los porcentajes de huevos flotantes con desarrollo normal, de huevos eclosionados y de larvas con desarrollo normal (Watanabe *et al.*, 1991a), lo que mejora notablemente la supervivencia larvaria. Esta mejora en el desarrollo normal del embrión y la larva está en concordancia con los resultados obtenidos en ratas diabéticas, donde se ha demostrado que los complementos de vitamina E en las dietas maternas reducen las malformaciones congénitas, incrementándose las concentraciones de tocoferol en los tejidos maternos, del embrión y del feto (Siman y Eriksson, 1997). Estos resultados parecen estar relacionados con la función de vitamina E como antioxidante inter- e intra- celular para mantener la homeostasis de metabolitos lábiles en la célula y en el plasma tisular.

En la actualidad se reconoce que la vitamina E es uno de los nutrientes mas importantes para la reproducción de los peces (Izquierdo *et al.*, 2001), y se ha demostrado que su inclusión dietética mejora la calidad de las puestas en un amplio rango de especies como carpa común, *Cyprinus carpio* (Watanabe y Takashima, 1977; Watanabe, 1990), ayu, *Plecoglossus altivelis* (Takeuchi *et al.*, 1981a), carpín, *Carassius auratus* (Sutjaritvongsanon, 1987), pargo japonés, *Pagrus major* (Watanabe *et al.*, 1985b; 1991a, b), pez gato, *Heteropneustes fossilis* (Dube, 1993), tilapia, *Oreochromis niloticus* (Schimittou, 1993), seriola coreana, *Seriola quinqueradiata* (Mushiake *et al.*, 1993), pearlspot, *Etroplus suratensis* (Shiranee y Natarajan, 1996), dorada *Sparus aurata* (Izquierdo *et al.*, 2001) y mero de manchas naranjas, *Epinephelus coioides* (Xiao *et al.*, 2003), así como en otras especies marinas (Verakunpiriya *et al.*, 1996). Así mismo, su exclusión, junto con la de la vitamina C, en dietas para trompetero australiano, *Latris linneata*, reduce de manera importante la calidad de las puestas (Morehead *et al.*, 2001).

En concreto, en la dorada, la alimentación con dietas deficientes en vitamina E reduce los porcentajes de huevos fecundados (Fernández-Palacios *et al.*, 2005; Figura 8) lo cual podría estar relacionado con la reducción en el número y motilidad de los espermatozoides que ha sido descrita para otros vertebrados (Donnelly *et al.*, 1999; Danikowski *et al.*, 2002) y en peces como el ayu, (Hsiao y Mak, 1978).

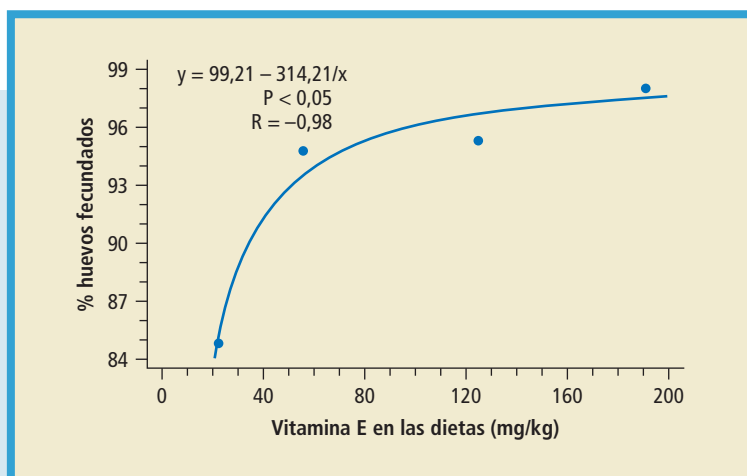


FIGURA 8.

Relación entre el nivel dietético de vitamina E en dietas para reproductores de dorada y el porcentaje de huevos fecundados.

Lee y Dabrowski (2004) alimentando reproductores de perca americana (*Perca flavescens*) con dietas deficientes en vitamina E encuentran que el nivel de tocoferol en el plasma espermático decrece significativamente y la viabilidad del espermatozoide se ve seriamente comprometida. Además, la alimentación con niveles insuficientes de vitamina E reduce el porcentaje de huevos viables con morfología normal en especies como trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (King, 1985), pargo japonés *Pagrus major*, (Watanabe *et al.*, 1991a, b), dorada *Sparus aurata*, (Fernández-Palacios *et al.*, 2005) y, en el chano, *Chanos chanos* (Emata *et al.*, 2000), cuando los niveles de vitamina C también son bajos. Así mismo, la supervivencia larvaria mejora significativamente con la inclusión de vitamina E en las dietas de reproductores de ayu (*Plecoglossus altivelis*, Takeuchi *et al.*, 1981a), trucha arco iris (King, 1985) o seriola coreana (*Seriola quinqueradiata*, Mushiake *et al.*, 1993). Las deficiencias en vitamina E en la dieta para reproductores también ocasionan la pérdida de la coloración sexual en especies como tilapia (*Oreochromis niloticus*) y reducen la actividad reproductora (Schmittou, 1993).

El contenido de vitamina E es generalmente alto en los huevos y bajo en los tejidos de los reproductores después del periodo de puesta



(Mukhopadhyay *et al.*, 2003). Así, durante la vitelogénesis en rodaballo *Scophthalmus maximus*, (Hemre *et al.*, 1994) o salmón Atlántico, *Salmo salar* (Lie *et al.*, 1993) la vitamina E es movilizada desde los tejidos periféricos hacia el ovario mediante lipoproteínas (Lie *et al.*, 1993). Por otra parte, Fernández-Palacios *et al.* (2005) encuentran un incremento significativo en la composición en lípidos totales en el huevo, cuando suplementan las dietas con niveles elevados de vitamina E, acompañado con un incremento en el contenido de EPA si esos niveles eran iguales o superiores a 125 mg/kg (Figura 9), en concordancia con la función protectora antioxidante de la vitamina E. También se encuentran relaciones entre el contenido de ácidos grasos y vitamina E en los huevos de seriola (*Seriola quinqueradiata*) (Verakunpiriya *et al.*, 1996) y róbalo japonés *Lateolabrax japonicus* (Chou y Chien, 2006).

Por su función antioxidante sobre los lípidos corporales, y debido al incremento en la susceptibilidad a la oxidación ocasionado por el grado de insaturación de los ácidos grasos, los requerimientos de vitamina E son dependientes del contenido dietético de ácidos grasos poliinsaturados, considerados como esenciales para los teleósteos. Así, un mayor contenido de ácidos grasos en la dieta requiere la inclusión

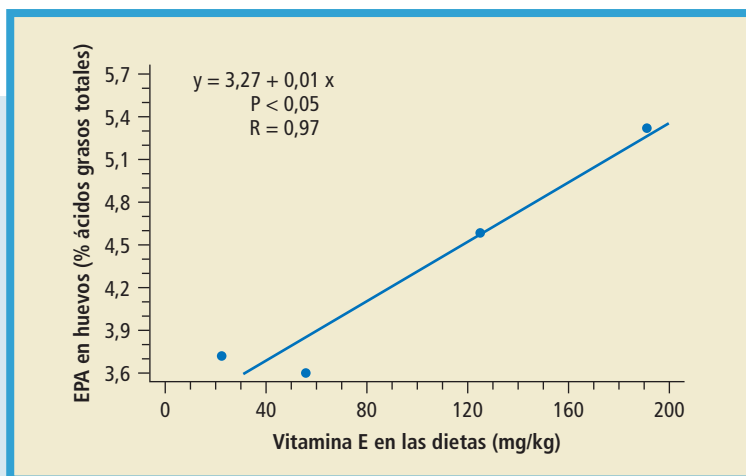


FIGURA 9.

Relación entre el nivel dietético de la vitamina E y el de EPA de los huevos.



de niveles superiores de vitamina E (Watanabe *et al.*, 1991a) y se ha sugerido que la presencia en la dieta de antioxidantes como la vitamina E es esencial para mantener la integridad estructural de los fosfolípidos en salmónidos alimentados con dietas ricas en n-3 HUFA (Cowey *et al.*, 1983). Por ejemplo, mientras que la elevación de los niveles de n-3 HUFA de 1,6 a 2,2 en dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*), con 125 mg/kg de vitamina E, no solo no mejora la calidad de las puestas sino que además ocasiona un alto porcentaje de larvas deformes con hipertrofia del saco vitelino (Fernández-Palacios *et al.*, 1995; Figura 10A), la elevación conjunta de los niveles de n-3 HUFA de 1,7 a 2,5 y de vitamina E de 125 a 190 mg/kg, mejora significativamente la calidad de las puestas y previene la formación de larvas deformes (Fernández-Palacios *et al.*, 2005; Figura 10B). De manera semejante, los niveles altos de DHA en las dietas junto con bajos niveles de vitamina E causan anomalías en larvas de bacalao del pacífico (*Gadus macrocephalus*) (Takeuchi *et al.*, 1994).

Koprucu y Seker (2003) encontraron que la suplementación de vitamina E en dietas para reproductores de guppy (*Poecilia reticulata*) ó espada (*Xiphophorus helleri*) aumenta la fecundidad de las dos especies, obteniendo los mejores resultados con 150 mg/kg. Dube (1993) también obtiene la mayor fecundidad en el pez gato *Heteropneustes fossilis* alimentando con dietas suplementadas con 150 mg/kg de vitamina E. En la dorada (*Sparus aurata*), la elevación del contenido de vitamina E en dietas prácticas para reproductores hasta 190 mg/kg mejora notablemente la calidad de las puestas (Fernández-Palacios *et al.*, 1998, 2005), mientras que estos niveles aún son subóptimos para reproductores de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) (Hemre *et al.*, 1994).

El ácido ascórbico juega también un papel relevante en la reproducción de los peces, como se ha visto particularmente en los salmónidos (Eskelinen, 1989; Blom y Dabrowski, 1995) en donde se ha señalado su importancia en la esteroidogénesis y vitelogénesis (Sandnes, 1991). La función antioxidante de la vitamina C, junto con la vitamina E, es fundamental para la protección de las células del esperma durante la espermatogénesis y hasta el momento de la fecundación, reduciendo el riesgo de peroxidación de los lípidos que iría en detrimento de la motilidad del esperma. De hecho, el contenido de ácido ascórbico en

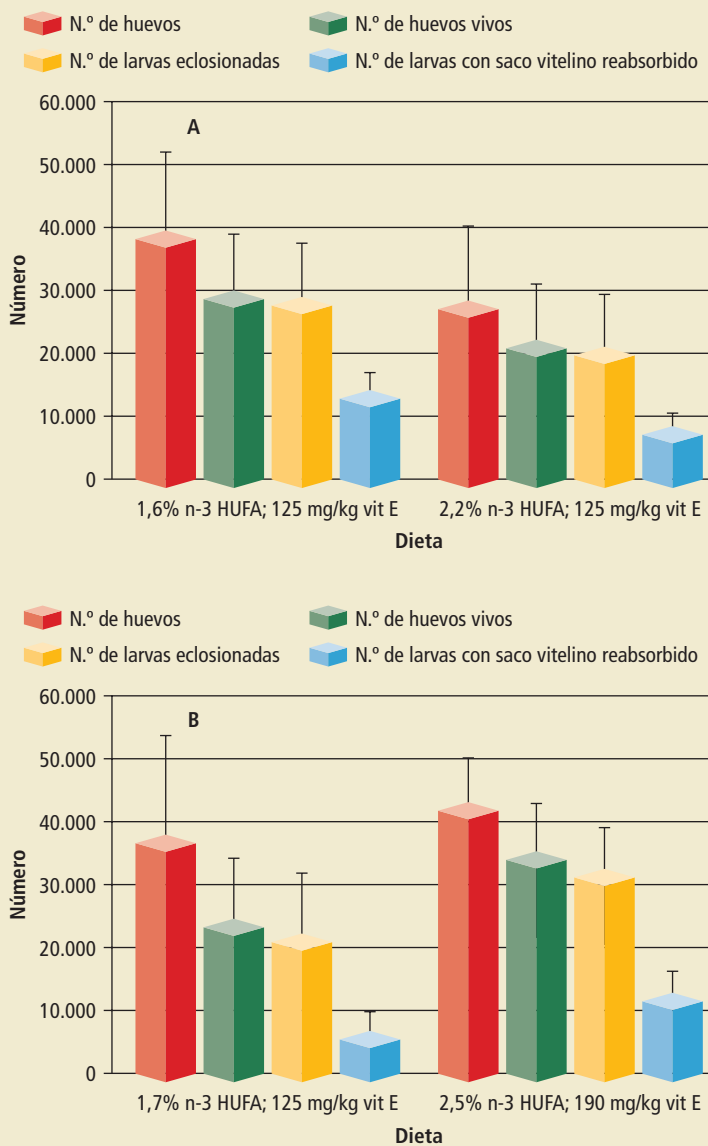


FIGURA 10.

Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de reproductores de dorada alimentados con dietas conteniendo diferentes niveles de n-3 HUFA y de vitamina E.



la dieta de los reproductores afecta a la concentración de esta vitamina en el fluido seminal y, aunque no ocurre así al principio de la puesta, está directamente relacionada con la concentración y motilidad del espermatozoides producido al final de la época de puesta (Ciereszco y Dabrowski, 1995). También el contenido de vitamina C en los huevos de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) refleja el nivel de este nutriente en la dieta y está asociado con la mejora de la calidad del huevo (Sandnes *et al.*, 1984). Así, el incremento en los niveles dietéticos de vitamina C hasta 1.200 mg/kg incrementa el porcentaje de eclosión de sus puestas (Ridelman, 1981). Sin embargo, en bacalao (*Gadus morhua*) no se pudo demostrar una relación entre los cambios en el contenido de vitamina C en el ovario y la calidad en términos de tasas de eclosión de los huevos (Mangor-Jensen *et al.*, 1993). Estos mismos porcentajes dietéticos en dietas para reproductores incrementan también el porcentaje de eclosión y de larvas normales en tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Soliman *et al.*, 1986). De esta manera, la supervivencia del embrión se ve claramente afectada por el contenido en vitamina C de las dietas de los reproductores, siendo esta vitamina particularmente importante en la síntesis de colágeno durante el desarrollo del embrión. Los estudios sobre requerimientos específicos de vitamina C son escasos y muestran grandes diferencias para las distintas especies. Así, mientras que en la trucha arco iris los requerimientos de vitamina C en los reproductores son ocho veces superiores que los de juveniles (Blom y Dabrowski, 1995), en otras especies, como bacalao, se han citado requerimientos menores (Mangor-Jensen *et al.*, 1993). Además, la calidad de las puestas en términos de fecundidad se ve afectada no sólo por el contenido dietético de vitamina C (Blom y Dabrowski, 1995) o vitamina E (Izquierdo y Fernández-Palacios, 1997; Fernández-Palacios *et al.*, 1998, 2005) como se ha visto anteriormente, sino incluso por la relación entre ambas vitaminas (Silveira *et al.*, 1996; Emata *et al.*, 2000).

La vitamina A es necesaria para el crecimiento, la reproducción y el desarrollo embrionario de los peces y éstos deben obtenerla de la dieta porque no son capaces de sintetizarla (Craik, 1985, Madden, 2001). La vitamina A está presente en los peces en varias formas incluyendo la vitamina A₁ o Retinol y la vitamina A₂ o Dehydroretinol (Palace y Werner, 2006). A pesar de que los requerimientos de vitamina A durante la



maduración gonadal y la puesta son poco conocidos, esta vitamina es considerada importante para el embrión y el desarrollo larvario debido a su importante papel en el desarrollo del esqueleto, la formación de la retina y la diferenciación de las células del sistema inmune. En el hígado de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) se ha observado un aumento de la concentración de retinol durante la maduración de las gónadas, lo cual sugiere la importancia de esta vitamina en la reproducción (Hemre *et al.*, 1994). De hecho, Furuita *et al.* (2003a) señalan que la alimentación de reproductores de lenguado del Pacífico (*Paralichthys olivaceus*) con vitamina A, aumenta la fecundidad, porcentaje de huevos viables y porcentaje de larvas normales obtenidas de dichos reproductores. Así mismo, la vitamina A, junto con la C, es importante para la fecundidad expresada en términos de producción de larvas de tres días en carpa cabezuda (*Aristichthys nobilis*) (Santiago y Gonzal, 2000), y junto con la C y la E para la maduración gonadal y la mejora del porcentaje de eclosión de esta misma especie.

Finalmente, otro componente dietético que parece ser importante para el desarrollo normal del embrión y de las larvas, al menos en salmónidos, es la tiamina (vitamina B₁). Por ejemplo, inyecciones de tiamina en hembras grávidas de salmón Atlántico (*Salmo salar*) reducen la mortalidad de su descendencia (Ketola *et al.*, 1998). También la concentración de tiamina en el huevo o en el saco vitelino de la larva se relaciona con la reducción del síndrome de mortalidad temprana en la trucha lacustre *Salvelinus namaycush* (Brown *et al.*, 1998), trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, salmón coho *Oncorhynchus kisutch* (Hornung *et al.*, 1998) y salmón Atlántico *Salmo salar* (Wooster y Bowser, 2000).

5.2.4. Carotenoides

Los carotenoides constituyen uno de los pigmentos más importantes en peces, con una amplia variedad de funciones incluyendo la protección frente a condiciones de iluminación adversas, la de actuar como provitamina A, la de regular la quimiotaxis en los espermatozoides y la de constituir potentes antioxidantes. Por todo ello son muy importantes en la reproducción de los peces y en el desarrollo normal de embriones y larvas. Sin embargo, durante más de cinco décadas



ha habido una gran controversia sobre la relación entre el contenido de carotenos del huevo y la calidad de los mismos en salmónidos, encontrándose en la bibliografía varias revisiones sobre este tema (Tacon, 1981, Craick, 1985, Choubert, 1986, Torrissen, 1990 y Torrissen y Christiansen, 1995). Así, los trabajos publicados sobre el efecto de la concentración de carotenos en la calidad del huevo en salmónidos han sido frecuentemente contradictorios. Mientras que algunos autores señalan una relación positiva entre la pigmentación del huevo y la fecundación ó la tasa de supervivencia en trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Harris, 1984; Craik, 1985), otros no han encontrado evidencias de esta relación (Torrissen, 1984; Craik y Harvey, 1986; Torrissen y Christiansen, 1995). Estas contradicciones parecen ser debidas a diferencias en la metodología empleada por los distintos autores incluyendo la edad de los reproductores, el contenido total de carotenoides de los huevos, el tipo de carotenoide (astaxantina, cantaxantina, etc.) utilizado en la dieta o determinado en el huevo, el tamaño de la muestra e incluso diferencias en el indicador empleado en la determinación de la calidad huevo.

La importancia de los carotenoides en la reproducción se puso claramente de manifiesto con los estudios controlados de alimentación de reproductores con distintos contenidos en carotenoides (Harris, 1984; Choubert y Blanc, 1993; Watanabe y Kiron, 1995). Tveranger (1986) alimentando reproductores de trucha arco iris con dietas complementadas con un 10 % de harina de krill encuentra una mejora en el porcentaje de fecundación en las puestas de estos reproductores comparadas con las de otros reproductores alimentados con una dieta no complementada, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas. En el pargo japonés (*Pagrus major*) la adición de astaxantina purificada en las dietas de reproductores mejora notablemente los porcentajes de huevos flotantes y de eclosión, así como el porcentaje de larvas normales (Watanabe y Kiron, 1995). También en especies de agua dulce, como la trucha arcoiris, la inclusión de astaxantina en dietas para reproductores tiene efectos positivos en los porcentajes de fecundación, de supervivencia del huevo y de eclosión (Ahmadi *et al.*, 2006). Pero el efecto de los carotenoides parece depender de la especie en estudio. Así, Vassallo-Agius *et al.* (2001 a) muestran que la



astaxantina dietética aumenta la fecundidad pero no mejora la calidad del huevo del jurel dentón (*Pseudocaranx dentex*). Resultados similares se obtienen para la seriola coreana (*Seriola quinqueradiata*) por Verakunpiriya *et al.* (1997).

Por otra parte, por su elevado poder antioxidante, el contenido adecuado de carotenoides en las dietas para reproductores podría estar relacionado con los niveles dietéticos de otros nutrientes. En la dorada (*Sparus aurata*), el incremento conjunto de los niveles de n-3 HUFA de 2.5 a 4 % junto con la elevación del contenido de carotenoides de 30 a 60 mg/kg, mejora significativamente la calidad de la puesta en términos de producción relativa (Figura 11) y porcentajes de huevos viables, de eclosión y de supervivencia larvaria (Scabini *et al.*, 2006).

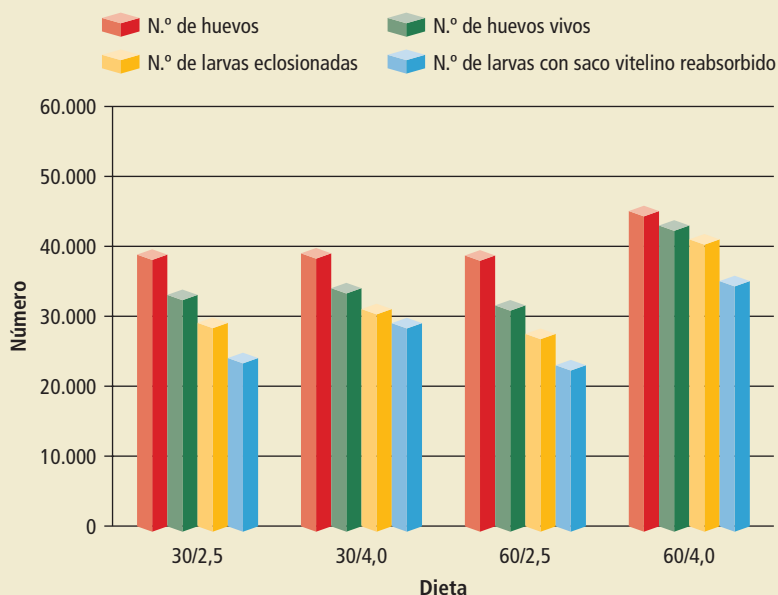


FIGURA 11.

Producciones relativas (por kg de hembra y por puesta) de reproductores de dorada alimentados con dietas conteniendo diferentes niveles de carotenoides y de n-3 HUFA.



También se han ensayado distintas fuentes de carotenoides, como el pimentón, cuya inclusión en dietas para reproductores de jurel dentón (*Pseudocaraux dentex*) mejora la fecundidad, fecundación, eclosión y supervivencia larvaria (Agius *et al.*, 2001). Sin embargo, la inclusión de β -caroteno no parece ejercer un efecto importante sobre la reproducción. Es posible que la pobre absorción intestinal de β -caroteno comparada con la de cantaxantina o astaxantina sea causante de la ausencia de efecto de este pigmento en la reproducción de los peces, ya que en estos vertebrados se ha encontrado una absorción y deposición preferente de hidroxi y keto carotenoides (Torrissen y Christiansen, 1995). Además, Miki *et al.* (1984) demostraron que aunque la cantaxantina y la astaxantina de la dieta de los reproductores se pueden incorporar a los huevos en el pargo japonés (*Pagrus major*), no se convierten en β -caroteno.

5.2.5. Otros nutrientes

Algunos ingredientes dietéticos han sido frecuentemente utilizados en la dieta para reproductores de peces por su alto valor nutritivo. Este es el caso del krill, cuya inclusión en las dietas para reproductores mejora notablemente la calidad de las puestas del pargo japonés (Watanabe *et al.*, 1991a). El estudio de los factores nutricionales responsables de esta mejora demostró que los lípidos que componen este ingrediente, tanto en su fracción polar como en la apolar tienen un gran valor nutritivo para los reproductores. Así, Watanabe *et al.* (1991a) identificaron como principales nutrientes funcionales a la fosfatidilcolina y astaxantina presentes en las fracciones polar y apolar, respectivamente. Otras investigaciones con el pargo japonés también corroboran que los fosfolípidos dietéticos mejoran la calidad del huevo (Watanabe *et al.*, 1991a, b). Los efectos beneficiosos de los fosfolípidos se han atribuido a su actividad inhibidora y a su capacidad para estabilizar los radicales libres (Watanabe y Kiron, 1995), teniendo una importante misión durante el desarrollo larvario (Izquierdo, 1996) y siendo catabolizados preferentemente después de la eclosión y antes del primer alimento exógeno (Rainuzzo *et al.*, 1997).

El triptófano, precursor de la serotonina entre otras funciones, puede afectar la maduración de las gónadas tanto en machos como en hembras. Dietas para reproductores del ayu (*Plecoglossus altivelis*)



complementadas con un 0,1 % de triptófano dan como resultado un aumento significativo de los niveles de testosterona favoreciendo la espermiación en los machos e induciendo la maduración de las hembras (Akiyama *et al.*, 1996).

La taurina es uno de los aminoácidos libres mas abundantes en los tejidos de peces y mamíferos y está implicada en procesos de antioxidación, osmorregulación y en modulación de neurotransmisores y de los niveles de calcio en las células, en la liberación de hormonas, y formación de sales biliares (Huxtable, 1992). Aunque se sabe poco de su valor nutricional para los reproductores de peces, se ha determinado que la inclusión de al menos 1 % de taurina en dietas para reproductores de seriola coreana (*Seriola quinqueradiata*) mejora la calidad de las puestas en términos de fecundidad, porcentajes de huevos viables y de fecundación (Matsunari *et al.*, 2006).

A pesar de no constituir nutrientes esenciales en la dieta, los carbohidratos realizan importantes funciones biológicas en los peces, constituyendo una fuente energética elemental en algunos tejidos. Por ello, su inclusión en la dieta para reproductores, dentro de niveles moderados que permitan su buena utilización por los peces, ha sido considerada interesante por algunos autores. Washburn *et al.* (1990) encuentran una reducción en la fecundidad relativa de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) cuando los reproductores son alimentados con dietas bajas en carbohidratos. Sin embargo, la alimentación de reproductores de bacalao (*Gadus morhua*) con distintos niveles de carbohidratos en sus dietas tienen un efecto pobre o incluso nulo sobre la calidad de las puestas (Mangor-Jensen y Birkeland, 1993).

Otros nutrientes que pueden afectar la calidad de la puesta son los nucleótidos. Así dietas enriquecidas con nucleótidos producen una mejora en la supervivencia de las larvas de eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) determinada diez días después de la eclosión, como resultado de un mejor desarrollo del intestino y, en consecuencia, de la mejor utilización posterior del alimento exógeno (Gonzalez-Vecino *et al.*, 2004). Además, los reproductores de halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) y de eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) alimentados con dietas enriquecidas con nucleótidos tienen una fecundidad relativa mas alta (González-Vecino, 2005).



Existen muy pocos trabajos publicados sobre el efecto de los minerales en las dietas de reproductores sobre la calidad de la puesta. En el cuadro 5 se indican los requerimientos genéricos para reproductores de peces omnívoros (Tacon, 1989). Takeuchi *et al.* (1981 b) señalan que reproductores de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentados con una dieta no complementada con minerales tienen puestas de peor calidad, en términos de bajos porcentajes de huevos viables y eclosión, que reproductores alimentados con una dieta complementada con minerales. En concreto, Watanabe *et al.* (1984 a, b) señalan que deficiencias en el contenido en fósforo de las dietas de reproductores de pargo japonés (*Pagrus major*) están relacionadas con una disminución de la fecundidad, los porcentajes de huevos viables y eclosión y un incremento del número de larvas anormales. En el mismo sentido Luquet y Watanabe (1986) correlacionan una menor fecundidad en el ayu (*Plecoglossus altivelis*) con una deficiencia en fósforo en la dieta. Sin embargo, en otros estudios con el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) Hardy *et al.* (1984) y con el salmón Atlántico (*Salmo salar*) Ketola (1985) no encuentran cambios en la calidad de las puestas de estas especies cuando suplementan con minerales las dietas de los reproductores.

CUADRO 5.
Requerimientos en minerales de reproductores de peces

PRINCIPALES MINERALES	%
Calcio	2.00 máx.
Fósforo	0.80 min, disponible
Magnesio	0.07, disponible

MINERALES TRAZA	ag/kg/min
Hierro	60.00
Zinc	100.00
Manganeso	50.00
Cobre	6.00
Cobalto	1.00
Yodo	6.00
Cromo	0.50
Selenio	0.20



5.3. EFECTO DEL NIVEL DE INGESTA

No solamente las deficiencias dietéticas en los nutrientes que se han presentado ocasionan reducciones en la calidad de las puestas, sino que incluso la restricción del alimento afecta seriamente a la reproducción. Diversos estudios en el medio silvestre, han señalado que la disponibilidad de alimento es el principal factor determinante de la fecundidad definida como el número de huevos maduros que son producidos por una hembra durante el ciclo anual de puesta (Wotton, 1979; Bromage *et al.*, 1992). Algunos de los estudios realizados en el medio silvestre se han realizado en regiones con una baja disponibilidad de comida, como por ejemplo ciertos ecosistemas fluviales, encontrándose que las especies que en ellas viven presentan menores fecundidades que en zonas con mayor cantidad de alimento. Esto se ha demostrado en especies como el rutilo, *Rutilus rutilus* (McKay y Mann, 1969; Kuznetsov y Khalitov, 1978), la brema, *Abramis brama* (Brylinska y Brylinski, 1972), el charolito, *Poeciliopsis occidentalis* (Constanz, 1975), el espinosillo, *Gasterosteus aculeatus* (Ali y Wootton, 2000), la trucha de río, *Salmo trutta* (Fry, 1949; McFadden *et al.*, 1965), la trucha lacustre, *Salvelinus namaycush* (Martin, 1970) o el salmón coho, *Oncorhynchus kisuth* (Stauffer, 1976). Sin embargo, la mejora en las condiciones de alimentación adelanta la edad de la primera puesta e incrementa la fecundidad tal como se ha visto en el salvelino, *Salvelinus fontinalis* (Vladykov, 1956). Este tipo de estudios también se han realizado en especies marinas tales como la platija, *Pleuronectes platessa* (Bagenal, 1966), eglefino (*Melanogrammus aeglefinus*) (Hodder, 1963), faneca noruega (*Gadus esmarkii*) (Raitt, 1968) ó bacalao del báltico (*Gadus morhua callaris*) (Kraus *et al.*, 2000 y Kraus, 2002) en donde se relacionaron las variaciones en la fecundidad de diferentes poblaciones con alteraciones en la ingesta de alimento.

De manera semejante, estudios realizados en cautividad demuestran que el tamaño de la ración afecta a la fecundidad y a otros parámetros determinantes de la calidad de la puesta. Así una tasa de alimentación insuficiente inhibe la maduración de las gónadas, como se ha demostrado en varias especies tales como el carpín, *Carassius auratus* (Sasayama y Takahashi, 1972), la lubina, *Dicentrarchus labrax* (Cerdá *et*



al., 1994 a) y el salmón Atlántico, *Salmo salar* (Berglund, 1995). En lubina, después de seis meses de alimentación de los reproductores con solo media ración, las tasas de crecimiento descienden, el periodo de puesta se retrasa y los huevos y larvas recién nacidas son más pequeñas que las obtenidas de peces comiendo la ración completa (Cerdá et al., 1994a). En hembras de lubina, los efectos negativos de la restricción de comida están asociados, al menos en parte, con la reducción de los niveles de estradiol en el plasma (Cerdá et al., 1994b), mientras que la expresión de los genes GtH no se ve afectada por la reducción de la ingesta en hembras maduras de carpín (Sohn et al., 1998). También en la trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, la restricción en la dieta resulta en una reducción de la fecundidad total (Springate et al., 1985; Jones y Bromage, 1987), mientras que en otras especies eglefino, *Melanogrammus aeglefinus* (Hislop et al., 1978; Robb, 1982), *Clupea harengus* (Ma et al., 1998), el guppy vivíparo, *Poecilia reticulata* (Hester, 1964; Dahlgren, 1980), tilapia, *Tilapia mossambica* (Mironova, 1977), rutilo, *Rutilus rutilus* (Kuznetsov y Khalitov, 1978), medaka, *Oryzias latipes* (Hirshfield, 1980), el cíclido cebra, *Cichlasoma nigrofasciatum* (Townsend y Wootton, 1984), la platija (*Pleuronectes platessa*) (Horwood et al., 1989), el chano, *Chanos chanos*, (Emata et al., 1996) o el bacalao, *Gadus morhua* (Karlsen et al., 1995; Kjesbu et al., 1998) incluso se pudo determinar una correlación positiva entre los niveles de ingesta y la fecundidad. En la tilapia, *Tilapia zillii*, también se obtuvo una mayor fecundidad cuando los reproductores eran alimentados con una ración mas elevada, aunque no se encontraron diferencias en el índice gonadosomático ni en el diámetro del huevo (Coward y Bromage, 1999). Por el contrario Bromley et al. (2000) no encuentran diferencias en la fecundidad potencial de reproductores de rodaballo (*Scophthalmus maximus*) alimentados con raciones de distinto tamaño. En este mismo sentido Yoneda y Wright (2005) en un experimento realizado con bacalao (*Gadus morhua*) mantenido a diferentes temperaturas y regímenes de alimentación, indican que la fecundidad potencial está positivamente correlacionada con el tamaño corporal, pero que ni la temperatura ni el régimen de alimentación afectan a esta relación. En híbridos de tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) también se encontraron diferencias en las fecundidades de reproductores



alimentados con diferente tasa de alimentación, aunque este factor no afectó al porcentaje de eclosión ni al diámetro de los huevos (Siddiqui *et al.*, 1997). Por el contrario en el espinosillo, *Gasterosteus aculeatus*, los niveles altos de ingesta además de aumentar la fecundidad incrementan el tamaño del huevo y del cuerpo de las hembras (Fletcher y Wootton, 1995). En esta misma especie se demostró que la ingesta también afecta la duración del periodo de tiempo entre puestas sucesivas que es menor en peces alimentados con raciones mayores (Ali y Wootton, 1999).

5.4. PERIODO DE TIEMPO NECESARIO PARA QUE LA DIETA INFLUYA SOBRE LA CALIDAD DE LA PUESTA

En algunas especies de peces como la dorada (*Sparus aurata*) o el pargo japonés (*Pagrus major*) la composición del huevo se vé rápidamente afectada por la dieta tras pocas semanas de alimentación de los reproductores (Watanabe *et al.*, 1985b; Fernández-Palacios *et al.*, 1995; Tandler *et al.*, 1995). En estas especies, con puestas continuas y periodos cortos de vitelogénesis, es posible mejorar la calidad de la puesta modificando la calidad nutritiva de las dietas de los reproductores incluso durante la estación de puesta (Fernández-Palacios *et al.*, 1995, 1997, 1998, 2005; Tandler *et al.*, 1995). En el pargo del golfo, *Lutjanus campechanus*, es necesaria la alimentación con dietas con aceites ricos en ácidos grasos poliinsaturados al menos dos meses antes del periodo de puesta (Papanikos, 2005). Igualmente, es posible mejorar la calidad del huevo y el porcentaje de eclosión en puestas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) alimentando los reproductores con las cantidades apropiadas de n-3 HUFA, durante el período de la vitelogénesis que es ligeramente más largo que en los espáridos (Navas *et al.*, 1997). En peces con más de seis meses de vitelogénesis (Frémont *et al.*, 1984), como en salmónidos, los reproductores deben ser alimentados con una dieta de buena calidad, varios meses antes de la época de puesta, para mejorar la calidad de la misma (Watanabe *et al.*, 1984d; Corraze *et al.*, 1993). Aunque los perfiles de ácidos grasos en el músculo del pez y en los huevos en desarrollo del salmón coho, *Oncorhynchus kisutch*, se ven afectados por la dieta, no se ha observado una mejora en la calidad de la puesta al alimentarlos con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Watanabe *et al.*, 1984c).



chus kisutch (Hardy *et al.*, 1990) reflejen los ácidos grasos dietéticos después de dos meses de alimentación, en los espáridos, la composición en ácidos grasos de las gónadas de la hembra se vé rápidamente afectada por el contenido en ácidos grasos de la dieta, permitiendo modificar la calidad del huevo en un período de tiempo corto. Harel *et al.* (1992) y Tandler *et al.* (1995) han demostrado que la composición lipídica de los tejidos de reproductores de dorada alcanza un equilibrio con los lípidos dietéticos después de sólo 15 días de alimentación.

Muchas especies de peces tienden a disminuir su tasa de ingesta durante la maduración sexual. El mecanismo responsable de la reducción de la ingesta durante el periodo de puesta no esta claro, pero afecta también a los peces en el medio natural (Trippel *et al.*, 1995; Link y Burnett, 2001). Quizás este relacionado con el hinchamiento de las hembras cuando comienzan la hidratación de los huevos en el ovario. Esto restringe espacio en la cavidad corporal y consecuentemente el volumen de alimento que puede ser ingerido. Otros factores como el nivel de hormonas pueden jugar un papel estrechamente relacionado con la regulación del apetito (Thorsen *et al.*, 2003). En consecuencia la energía y nutrientes necesarios para el desarrollo gonadal la toman de sus reservas corporales. La trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss*, moviliza las reservas lipídicas de la carcasa y vísceras (Nassour y Leger, 1989). El pez gato africano, *Clarius batrachus*, usa la grasa abdominal como la mayor fuente de energía para la maduración sexual (Lal y Singh, 1987). El salmón Atlántico, *Salmo salar*, utiliza las proteínas y lípidos del músculo (Aksnes *et al.*, 1986) y el bacalao, *Gadus morhua*, utiliza las reservas acumuladas en el hígado (Tocher y Harvie, 1988). Los reproductores de dorada continúan alimentándose durante la maduración sexual y a lo largo del periodo de puesta llegando a producir una biomasa de huevos equivalente a su propio peso corporal. Bajo estas circunstancias, los lípidos depositados en los ovarios deben proceder de la dieta de los reproductores y/o de las reservas endógenas. Considerando estas características, la composición de ácidos grasos de los huevos puede ser modificada durante la época de desove y por consiguiente mejorar la calidad de la puesta (Almansa *et al.*, 1999). El rodaballo podría ser una excepción a esta observación y es importante la alimentación de los reproductores con dietas de alta calidad nutritiva



durante la vitelogénesis y el período de puesta. La composición de los ovarios del rodaballo se ve más afectada por la dieta durante las fases tempranas de desarrollo gonadal (Lie *et al.*, 1993).

BIBLIOGRAFÍA

- ABIDIN, M.Z., R. HASHIM and A.S.C. CHONG. 2006. Influence of dietary protein levels on growth and egg quality in broodstock female bagrid catfish (*Mystus nemurus* Cuv. & Val.). *Aquac. Res.*, 37:416-418
- ABY-AYAD, S. M. E. A., C. MELARD and P. KESTEMONT. 1997. Effects of fatty acids in Eurasian perch broodstock diet on egg fatty acid composition and larvae stress resistance. *Aquacult. Int.*, 5: 161-168.
- AGIUS, R.V., T. WATANABE, S. SATOH, V. KIRON, H. IMAZUMI, T. YAMAZAKI and K. KAWANO. 2001. Supplementation of paprika as a carotenoid source in soft-dry pellets for broodstock yellowtail *Seriola quinqueradiata* (Temminck & Schlegel). *Aquac. Res.*, 32 (1): 263-272.
- AHMADI, M. R., A. A. BAZYAR, S. SAFI , T. YTRESTØYL and B. BJERKENG. 2006. Effects of dietary astaxanthin supplementation on reproductive characteristics of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Appl. Ichthyol.*, 22:388-394
- AIJUN, M., C. CHAO, L. JILIN, C. SIQING and Z. ZHIMIN. 2005. The effect of protein and n-3HUFA on the reproduction of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Marine fisheries research (Haiyang Shuichan Yanjiu)*, 26 (1): 7-12.
- AKIYAMA, T., M. SHIRAAISHI, T. YAMAMOTO and T. UNUMA. 1996. Effect of dietary tryptophan on maturation of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fisheries Sci.*, 62 (5): 776-782.
- AKSNES, A., B. GJERDE and S.O. ROALD. 1986. Biological, chemical and organoleptic changes during maturation of farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 53 (1): 7-20.
- AL HAFEDH, Y.S., A.Q. SIDDIQUI and M.Y. AL SAIADY. 1999. Effects of dietary protein levels on gonad maturation, size and age at first maturity, fecundity and growth of Nile tilapia. *Aquacult. Int.*, 7: 319-332.
- ALI, M. and R. J. WOOTTON. 1999. Effect of variable food levels on reproductive performance of breeding female three-spined sticklebacks. *J. Fish Biol.*, 55:1040-1053.
- ALI, M. and R.J. WOOTTON. 2000. Variation in rates of food consumption and evidence for compensatory responses in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. in relation to growth and reproduction. *Ecol. Fresh. Fish*, 9 (1-2): 103-108.



- ALMANSA, E., M.J. PEREZ, J.R. CEJAS, P. BADIA, J.E. VILLAMANDOS and A. LORENZO. 1999. Influence of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) dietary fatty acids on egg quality and egg fatty acid composition throughout the spawning season *Aquaculture*, 170 (3-4): 323-336.
- ASTURIANO, J.F. 1999. El proceso reproductivo de la lubina europea (*Dicentrarchus labrax* L.). Efectos de los ácidos grasos de la dieta: estudios «in vivo» e «in vitro». Tesis Doctoral, Universidad de Valencia, España, 251 pp.
- BAGENAL, T. M. 1966. The ecological and geographical aspects of the fecundity of the plaice. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 46:161-186.
- BELL, J.G. and J.R. SARGENT. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. *Aquaculture*, 218 (1-4): 491-499.
- BELL, M.V., R.J. HENDERSON and J.R. SARGENT. 1986. The role of polyunsaturated fatty acids in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83 B: 711-719.
- BELL, J.G., D.R. TOCHER, F. M. MACDONALD and J.R. SARGENT. 1994. Effects of diets rich in linoleic (18:2n - 6) and alpha -linolenic (18:3n - 3) acids on the growth, lipid class and fatty acid compositions and eicosanoid production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Physiol. Biochem.*, 13 (2): 105-118.
- BELL, J.G., B.M. FARNDAL, M.P. BRUCE, J.M. NAVAS and M. CARILLO. 1997. Effects of broodstock dietary lipid on fatty acid compositions of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 149 (1-2): 107-119.
- BENÍTEZ-SANTANA, T., R. MASUDA, E. JUÁREZ CARRILLO, E. GANUZA, A. VALENCIA, C.M. HERNÁNDEZ-CRUZ and M.S. IZQUIERDO. 2007. Dietary n-3 HUFA deficiency induces a reduced visual response in gilthead seabream. *Aquaculture*, 264: 408-417.
- BERGLUND, L. 1995. Effects of spring temperature and feeding regime on sexual maturation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) male parr. In: Goetz, F.W., Thomas, P. (Eds.), *Reproductive Physiology of Fish. Fish Symp.* 95, Austin, 1995, pp. 170-172.
- BLOM, J.H. and K. DABROWSKI. 1995. Reproductive success of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to graded dietary ascorbyl monophosphate levels. *Biol. Reprod.*, 52: 1073-1080.
- BROMAGE, N., J. JONES, C. RANDALL, M. THRUSH, M. DAVIES, J. SPRINGATE, J. DUSTON and G. BAKER. 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 100: 141-166.
- BROMLEY, P., C. RAVIER and P. R. WITTIHAME. 2000. The influence of feeding regime on sexual maturation, fecundity and atresia in first-time spawning turbot. *J. Fish Biol.*, 56:264-278.



- BROOKS, S., C.R. TYLER and J.P. SUMPTER. 1997. Egg quality in fish: What makes a good egg?. *Rev. Fish Biol. Fisher.*, 7: 387-416.
- BROWN, S.B., J.O. FITZSIMONS, V.T. PALACE and L. VANDENBILLAARDT. 1998. Thiamin and early mortality syndrome in lake trout. In: McOonald, G., Fitzsimons, J.O., Honeyfield, O.C. (Eds.), *Early Life Stage Mortality Syndrome in Fishes of the Great Lake and Baltic Sea*. American Fisheries Society, Symposium, vol. 21, pp. 18-25, Bethesda, MD, USA.
- BRUCE, M.P., R.J. SHIELDS, M.V. BELL and N.R. BROMAGE. 1993. Lipid class and fatty acid composition of eggs of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), in relation to egg quality in captive broodstock. *Aquacult. Fish. Manag.*, 24 (3): 417-422.
- BRUCE, M., F. OYEN, G. BELL, J.F. ASTURIANO, B. FARNDAL, J. RAMOS, N. BROMAGE, M. CARRILLO and S. ZANUY. 1999. Development of broodstock diets for the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) with special emphasis on the importance of n-3 and n-6 HUFA to reproductive performance. *Aquaculture*, 117 (1-4): 85-97.
- BRYLINSKA, M. and E. BRYLINSKI. 1972. Methods for estimation of fish fecundity on the example of bream (*Abramis brama* L.). *Rocz. Nauk Roln.*, 94-H2: 7-40
- BUENO, D. 2001. Evaluación del cultivo larvario de la dorada (*Sparus aurata* L.) en función de la calidad de puesta. Tesis de Master, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España, 63 pp.
- CARRILLO, M., S. ZANUY, F. PRAT, J. CERDA, E. MAÑANOS, N. BROMAGE, J. RAMOS and O. KAH. 1995. Nutritional and photoperiodic effects on hormonal cycles and quality of spawning in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Neth. J. Zool.*, 45 (1-2): 204-209.
- CERDÁ, J., M. CARRILLO, S. ZANUY and J. RAMOS. 1994a. Effect of food ration on estrogen and vitellogenin plasma levels, fecundity and larval survival in captive sea bass, *Dicentrarchus labrax*: Preliminary observations. *Aquat. Living Resour.*, 7: 255-266.
- CERDÁ, J., M. CARRILLO, S. ZANUY, J. RAMOS and M. DE LA HIGUERA. 1994b. Influence of nutritional composition of diet on sea bass *Dicentrarchus labrax* L., reproductive performance and egg and larvae quality. *Aquaculture*, 128: 345-361.
- CHEW, B. P. 1996. Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 59: 103-114.
- CHONG, A.S.C., S. ISHAK, Z. OSMAN and R. HASHIM. 2004. Effect of dietary protein level on the reproductive performance of female swordtails *Xiphophorus helleri* (Poeciliidae). *Aquaculture*, 234: 381-392.



- CHOU, Y.H. and Y.H. CHIEN. 2006. Effects of astaxanthin and vitamin E supplement in Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus* broodstock diet on their spawning performance and egg quality. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 33(2): 157-169.
- CHOUBERT, G. 1986. Pigments caroténoides et reproduction des poissons. *Bull. Fr. Peche Piscic.*, 300: 25-32.
- CHOUBERT, G. and J.M. BLANC. 1993. Muscle pigmentation changes during and after spawning in male and female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, red dietary carotenoids. *Aquat. Living Resour.*, 6: 163-168.
- CHOUBERT, G., J.M. BLANC and H. POISSON. 1998. Effects of dietary keto-carotenoids (canthaxanthin and astaxanthin) on the reproductive performance of female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult. Nutr.*, 4 (4): 249-254.
- CHRISTIANSEN, R. and O.J. TORRISSEN. 1997. Effects of dietary astaxanthin supplementation on fertilization and egg survival in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 153 (1-2): 51-62.
- CIERESZCO, A. and K. DABROWSKI. 1995. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across season study. *Biol. Reprod.* 52: 982-988.
- COEHLO, M. B. 1991. Functions of vitamin E. In: M.B. Coehlo (ed.) *Vitamin E in Animal Nutrition and Management*. pp 11-17.
- CONSTANZ, G. D. 1975. Behavioral ecology of mating in the male Gila topminnow, *Poeciliopsis occidentalis* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *Ecology*, 56: 966-973.
- CORRAZE, G., L. LARROQUET, G. MAISSE, O. BLANC and S. KAUSHIK. 1993. Effect of temperature and of dietary lipid source on female broodstock performance and fatty acid composition of the eggs of rainbow trout. *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz (France), Ed. INRA, Paris 1993 (Les Colloques, no. 61), pp. 61-66.
- COWARD, K. and N.R. BROMAGE. 1999. Spawning frequency, fecundity, egg size and ovarian histology in groups of *Tilapia zillii* maintained upon two distinct food ration sizes from first feeding to sexual maturity. *Aquat. Living Resour.*, 12 (1): 11-22.
- COWEY, C.B., J.W. ADRON and A. YOUNGSTON. 1983. The vitamin E requirement of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) given diets containing polyunsaturated fatty acids derived from fish oil. *Aquaculture*, 30: 85-93.
- CRAIK, J.C.A. 1985. Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. *Aquaculture*, 47: 61-88.



- CRAIK, J.C.A. and S.M. HARVEY. 1986. Egg quality in the Atlantic salmon. *Ices Council Meeting 1986* (Collected Papers), Ices, Copenhagen (Denmark), 10 pp.
- CUMARANATUNGA, P.R. and K.L. MALLIKA. 1991. Effects of different levels of dietary protein and a legume vigna catieng on gonadal development in *Oreochromis niloticus* (L.). Proceedings of The Fourth Asian Fish Nutrition Workshop. *Special publication. Asian Fisheries Society*, 5: 125-133.
- DABROWSKI, K. and J.H. BLOM. 1994. Ascorbic acid deposition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs and survival of embryos. *Comp. Biochem. Physiol.*, 108 A: 129-135.
- DAHLGREN, B.T. 1980. The effects of three different dietary protein levels on the fecundity in the guppy, *Poecilia reticulata* (Peters). *J. Fish Biol.*, 16 (1): 83-97.
- DANIKOWSKI, S., H.P. SALLMANN and G. FLACHOWSKY. 2002. Influence of high levels of vitamin E on sperm parameters of cock. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 86: 376-382.
- DANTAGNAN, H. P., A. S. BORQUEZ, I. N. VALDEBENITO, I. A. SALGADO, E. A. SERRANO and M. S. IZQUIERDO. 2007. Lipid and fatty acid composition during embryo and larval development of puye *Galaxias maculatus* Jenyns, 1842, obtained from estuarine, freshwater and cultured populations *J. Fish Biol.* 70:770-781.
- DE SILVA, S.S. and K. RADAMPOLA. 1990. Effect of dietary protein level on the reproductive performance of *Oreochromis niloticus*. *Proceedings of The Second Asian Fisheries Forum*, Tokyo, Japan. pp. 559-563.
- DHERT, P., L.C. LIM, P. LAVENS, T.M. CHAO, R. CHOU, P. LAVENS, P. SORGELOOS, E. JASPERS and F. OLLEVIER. 1991. Effect of dietary essential fatty acids on egg quality and larviculture success of the greasy grouper (*Epinephelus tauvina*). *LARVI '91. Special Publication, European Aquaculture Society*, 15: 58-62.
- DOMARCO, E. 2001. Efecto de la calidad de la dieta sobre las puestas de dorada (*Sparus aurata*). Tesis de Master, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España. 67 pp.
- DONNELLY, E.T., N. MCCLURE, and S.E.M. LEWIS. 1999. The effect of ascorbate and α -tocopherol supplementation in vitro on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis*, 14: 505-511.
- DUBE, K. 1993. Effect of vitamin E on the fecundity and maturity of *Heteropneustes fossilis* (Bloch.). *Proceedings of the The Third Indian Fisheries Forum*, Pant Nagar, U.P. pp. 101-103.
- DURAY, M., H. KOHNO and F. PASCUAL. 1994. The effect of lipid enriched broodstock diets on spawning and on egg and larval quality of hatchery bred rabbitfish (*Siganus guttatus*). *Philipp. Sci.*, 31: 42-57.



- EL-SAYED, A.M., C.R. MANSOUR and A.A. EZZAT. 2003. Effects of dietary protein level on spawning performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) broodstock reared at different water salinities. *Aquaculture*, 220 (1-4):619-632.
- EMATA, A.C. and I. BORLONGAN. 2003. A practical broodstock diet for the mangrove red snapper, *Lutjanus argentimaculatus*. *Aquaculture*, 225 (1-4):83-88.
- EMATA, A.C., C. MARTE, I. BORLONGAN and J. NOCILLADO. 1996. The effect of dietary lipid and protein and ration size on the reproductive performance of cage reared milkfish broodstock. Feeds for small-scale aquaculture. *Proceedings of the Nacional Seminar-Workshop on Fish Nutrition and Feeds*. Tigbauan, Iloilo, Philippines, p. 122.
- EMATA, A., I. BORLONGAN and J. DARNASO. 2000. Dietary vitamin C and E supplementation and reproduction of milkfish *Chanos chanos* Forsskal. *Aquac. Res.*, 31(7): 557-564.
- ESKELINEN, P. 1989. Effects of different diets on egg production and egg quality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 79 (1-4): 275-281.
- FALK-PETERSEN, S., Y. FALK-PETERSEN, J.R. SARGENT and T. HANG. 1986. Lipid class and fatty acid composition of eggs from the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 52: 207-211.
- FALK-PETERSEN, S., J.R. SARGENT, C. FOX, L.B. FALK-PETERSEN, T. HAUG and E. KJØRSVIK. 1989. Lipids in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) eggs from planktonic samples in Northern Norway. *Mar. Biol.*, 101: 553-556.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., M. S. IZQUIERDO, L. ROBAINA, A. VALENCIA, M. SALHI and J.M. VERGARA. 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) *Aquaculture*, 132 (3-4): 325-337.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., M. S. IZQUIERDO, L. ROBAINA, A. VALENCIA, M. SALHI and D. MONTERO. 1997. The effect of dietary protein and lipid from squid and fish meals on egg quality of broodstock for gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 148 (2-3): 233-246.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., M.S. IZQUIERDO, M. GONZALEZ, L. ROBAINA and A. VALENCIA. 1998. Combined effect of dietary α -tocopherol and n -3 HUFA on egg quality of gilthead seabream broodstock (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 161: 475-476.
- FERNÁNDEZ-PALACIOS, H., IZQUIERDO, M.S. y L. ROBAINA. 2005. Efecto de distintas dietas para reproductores de dorada (*Sparus aurata*) sobre la calidad de sus puestas. *Inf. Tec. Inst. Canario Cienc. Mar.*, n.º 12, 200 pp.
- FLETCHER, D.A. and R.J. WOOTTON. 1995. A hierarchical response to differences in ration size in the reproductive performance of female three spined sticklebacks. *J. Fish Biol.*, 46 (4): 657-668.



- FRÉMONT, L., C. LÉGER, B. PETRIDOU and M.T. GOZZELINO. 1984. Effects of a polyunsaturated fatty acid deficient diet on profiles of serum vitellogenin and lipoprotein in vitellogenic trout (*Salmo gairdneri*). *Lipids*, 19 (7): 522-528.
- FRY, F.J. 1949. Statistics of a lake trout fishery. *Biometrics*, 5: 27-67.
- FURUITA, H., H. TANAKA, T. YAMAMOTO, N. SUZUKI and T. TAKEUCHI. 2002. Effects of high levels of n-3 HUFA in broodstock diet on egg quality and egg fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 210 (1-4): 323-333.
- FURUITA, H., H. TANAKA, T. YAMAMOTO, N. SUZUKI and T. TAKEUCHI. 2003a. Supplemental effect of vitamin A in diet on the reproductive performance and egg quality of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (T&S). *Aquac. Res.*, 34(6): 461-468.
- FURUITA, H., T. YAMAMOTO, T. SHIMA, N. and T. TAKEUCHI. 2003b. Effect of arachidonic acid levels in broodstock diet on larval and egg quality of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 220 (1-4): 725-735.
- FYHN, H.J. 1989. First feeding of marine fish larvae: Are free amino acids the source of energy?. *Aquaculture*, 80: 111-120.
- FYHN, H. J. and B. SERIGSTAD. 1987. Free amino acids as energy substrate in developing eggs and larvae of the cod *Gadus morhua*. *Mar. Biol.* 96: 335-341.
- GANGA, R., J.G. BELL, D. MONTERO, L. ROBAINA, M.J. CABALLERO and M.S. IZQUIERDO, 2005. Effect of feeding gilthead seabream (*Sparus aurata*) with vegetable lipid sources on two potential immunomodulator products: prostanoids and leptins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 142: 410-418.
- GANGA, R., L. TORT, L. ACERETE, D. MONTERO and M.S. IZQUIERDO. 2006. Modulation of ACTH-induced cortisol release by polyunsaturated fatty acids in interregional cells from gilthead seabream, *Sparus aurata*. *J. Endocrinol.* 190, 39-45.
- GONZÁLEZ-VECINO, J. L. 2005. Nucleotide enhancement of diets, fish reproduction and egg quality (*Hippoglossus hippoglossus*, *Melanogrammus aeglefinus*). *Diss. Absts. Int. Pt. C., Worldwide*. Vol. 66 (2): 310.
- GONZÁLEZ-VECINO, J. L., C. J. CUTIS, R.S. BATTY, C. MAZORRA DE QUERO, P. L. GREENHAFF and S. WADSWORTH. 2004. Short & long term effects of a nucleotide enriched broodstock diet on the reproductive performance of haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.). *11th International Symposium on nutrition and Feeding in Fish*. Phuket. Thailand. p. 99.
- GUNASEKERA, R.M., K.F. SHIM and T.J. LAM. 1995. Effect of dietary protein level on puberty, oocyte growth and egg chemical composition in the tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) *Aquaculture*, 134 (1-2): 169-183.



- GUNASEKERA, R.M., K.F. SHIM and T.J. LAM. 1996a. Effect of dietary protein level on spawning performance and amino acid composition of eggs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*, 146 (1-2): 121-134.
- GUNASEKERA, R.M., K.F. SHIM and T.J. LAM. 1996b. Influence of protein content of broodstock diets on larval quality and performance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 146 (3-4): 245-259.
- GUNASEKERA, R.M., K.F. SHIM and T.J. LAM. 1997. Influence of dietary protein content on the distribution of amino acids in oocytes, serum and muscle of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture*, 152 (1-4): 205-221.
- HARDY, R.W., K.D. SHEARER and I.B. KING. 1984. Proximate and elemental composition of developing eggs and maternal soma of pen-reared coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) fed production and trace element fortified diets. *Aquaculture*, 43 (1-3): 147-165.
- HARDY, R.W., T. MATSUMOTO, W.T. FAIRGRIEVE and R.R. STICKNEY. 1990. The effects of dietary lipid source on muscle and egg fatty acid composition and reproductive performance of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). In: Takeda, M., Watanabe, T. (Eds.), *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture. Proc. Third Int. Symp. on Feeding and Nutr. in Fish*, Japan Translation Center, Tokyo, pp. 347-356.
- HAREL, M., A. TANDLER and G.W. KISSIL. 1992. The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead sea bream *S. aurata* females and subsequent effects on egg composition and egg quality. *Isr. J. Aquacult. Bamid.*, 44 (4):127.
- HAREL, M., A. TANDLER, G.W. KISSIL and S.W. APPLEBAUM. 1994. The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead seabream (*Sparus aurata*) females and the subsequent effects on egg composition and egg quality. *Brit. J. Nutr.*, 72: 45-58.
- HAREL, M., A. TANDLER, G.W. KISSIL and S.W. APPLEBAUM. 1995. The role of broodstock dietary protein in vitellogenin synthesis and oocyte development, and its effect on reproductive performance and egg quality in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, The University of Texas at Austin, (USA), pp. 105-107.
- HARRIS, L.E. 1984. Effects of a broodfish diet fortified with canthaxanthin on female fecundity and egg color. *Aquaculture*, 43: 179-183.
- HART, N.F. 1990. Fertilization in teleost fishes: Mechanism of sperm-egg interactions. *Int. Rev. Cytol.*, 121: 1-66.



- HEMRE, G.I., A. MANGOR-JENSEN and O. LIE. 1994. Broodstock nutrition in turbot (*Scophthalmus maximus*) effect of dietary vitamin E. *Fiskeridir. Skr., Ser. Emaer.*, 8:21-29.
- HESTER, F. J. 1964. Effects of food supply on fecundity in the female guppy, *Lebistes reticulatus* (Peters). *J. Fish. Res. Board Can.*, 21: 757-764.
- HIRSHFIELD, M. F. 1980. An experimental analysis of reproductive effort and cost in the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. *Ecology*, 61: 282-292.
- HISLOP, J.R.G., A.P. ROBB and J.A. GAULD. 1978. Observations on effects of feeding level on growth and reproduction in haddock, *Melanogrammus aeglefinus* (L.) in captivity. *J. Fish Biol.*, 13 (1): 85-98.
- HODDER, V. M. 1963. Fecundity of Grand Bank haddock. *J. Fish. Res. Board Can.*, 20 (6): 1465-1487.
- HORNUNG, M.W., L. MILLER, R.E. PETERSON, S. MARCQUENSKI and S.B. BROWN. 1998. Efficacy of thiamine, astaxanthin, beta -carotene, and thyroxine treatments in reducing early mortality syndrome in Lake Michigan salmonid embryos. *Am. Fish. Soc. Symp.*, 21: 124-134.
- HORTON, H.R., L. A. MORAN, R. S. OCHS, J. D. RAWN and K. G. SCRIMGEOUR. 1996. Mechanisms of enzymes. In: P. Carey (ed.) *Principles of Biochemistry*, 2nd ed. p 149. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ. USA.
- HORWOOD, J.W., M.G. WALKER and P. WITTHAMES. 1989. The effect of feeding levels on the fecundity of plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Mar. Biol. Assoc. UK.*, 69 (1): 81-92.
- HSIAO, S.M. and W.C. MAK. 1978. Artificial fertilization and incubation of fertilized eggs pond reared ayu. *China Fish. Mon.*, 305: 2-11.
- HUBER, J. T. 1988. Vitamins in ruminant nutrition. In: D. C. Church (ed.) *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. pp 313-325. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ. USA.
- HUXTABLE, R. J. 1992. Physiological actions of taurine. *Physiol. Rev.*, 72: 101-163.
- HYLLNER, S.J., H. FERNÁNDEZ-PALACIOS, D.O.J. LARSSON and C. HAUX. 1995. Amino acid composition and endocrine control of vitelline envelope proteins in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol. Reprod. Dev.*, 41: 339-347.
- IZQUIERDO, M.S. 1996. Essential fatty acid requirements of cultured marine fish larvae. *Aquacult. Nutr.*, 2: 183-191.
- IZQUIERDO, M.S. and H. FERNÁNDEZ-PALACIOS. 1997. Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock. *Cah. Options Mediterr.*, 22: 243-264.



- IZQUIERDO, M.S., H. FERNÁNDEZ-PALACIOS and A.G.J. TACON. 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197: 25-42.
- JONES, J. and N.R. BROMAGE. 1987. The influence of ration size in the reproductive performance of female rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Proceedings of the Third International Symposium on Reproductive Physiology of Fish*, Memorial University of Newfoundland St. John's, Newfoundland, Canada, p. 202.
- KAH, O., S. ZANUY, P. PRADELLES, J. CERDÁ and M. CARRILLO. 1994. An enzyme immunoassay for salmon gonadotropin-releasing hormone and its application to the study of the effects of diet on brain and pituitary GnRH in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 95: 464-474.
- KARLSEN, O., J.C. HOLM and O.S. KJESBU. 1995. Effects of periodic starvation on reproductive investment in first time spawning Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture*, 133 (2): 159-170.
- KETOLA, H.G. 1985. Mineral supplementation of Atlantic salmon broodstock diets. In: *Salmonid Reproduction: an International Symposium* (R.N. Iwamoto & S.Sower, eds.), Washington Sea Grant program, University of Washington, Seattle, p.111.
- KETOLA, H.G., P.R. BOWSER, L.R. WOOSTER, L.R. WEDGE and S. HURST. 1998. Thiamin remediation of early mortality in fry of Atlantic salmon from Cayuga Lake. *Great Lakes Res. Rev.*, 3: 21-26.
- KHAN, M. A., A. K. JAFRI and N. K. CHADHA. 2005. Effects of varying dietary protein levels on growth, reproductive performance, body and egg composition of rohu, *Labeo rohita* (Hamilton). *Aquacult. Nutr.*, 11: 11-17.
- KING, I.B. 1985. Influence of vitamin E in reproduction in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) *Diss. Abst. Int. Pt. B - Sci. & Eng.*, 46 (2) 185 pp.
- KJESBU, O.S., P.R. WITTHAMES, P. SOLEMDAL and M.G. WALKER. 1998. Temporal variations in the fecundity of Arcto-Norwegian cod (*Gadus morhua*) in response to natural changes in food and temperature. *J. Sea Res.*, 40 (3-4): 303-321.
- KNIGHT, J., J.W. HOLLAND, L.A. BOWDEN, K. HALLIDAY and A.F. ROWLEY. 1995. Eicosanoid generating capacities of different tissues from the rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*. *Lipids*, 30 (5): 451-458.
- KOPRÜCÜ, K. and E. SEKER. 2003. Effect of supplemental dietary vitamin E on the fecundity of guppy (*Poecilia reticulata* Peters, 1895) and swordtail (*Xiphophorus helleri* Heckel, 1848). *F. Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 15 (1): 83-88.
- KOVEN, W., Y. BARR, S. LUTZKY, I. BEN-ATIA, R. WEISS, M. HAREL, P. BEHRENS and A. TANDLER. 2001. The effect of dietary arachidonic acid (20:4n-6) on growth,



- survival and resistance to handling stress in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 193 (1-2): 107-122.
- KRAUS, G. 2002. Variability in egg production of cod (*Gadus morhua callarias* L.) in the Central Baltic Sea. Tesis Doctoral, Universidad de Kiel, Alemania. 92 pp.
- KRAUS, G., A. MUELLER, K. TRELLA and F.W. KOESTER. 2000. Fecundity of Baltic cod: temporal and spatial variation. *J. Fish Biol.*, 56 (6): 1327-1341.
- KUZNETZOV, V. A. and N. K. KHALITOV. 1978. Alterations in the fecundity and egg quality of the roach, *Rutilus rutilus*, in connection with different feeding conditions. *J. Ichthyol.*, 18: 63-70.
- LABBE, C., M. LOIR, S. KAUSHIK and G. MAISSE. 1993. The influence of both rearing and dietary lipid origin on fatty acid composition of spermatozoan polar lipids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Effect on sperm cryopreservation tolerance. *Fish Nutrition in Practice*, Biarritz (France), Ed. INRA, Paris 1993 (Les Colloques, n.º 61), pp. 49-59.
- LAL, B. and T.P. SINGH. 1987. Changes in tissue lipid levels in the freshwater catfish *Clarias batrachus* associated with the reproductive cycle. *Fish Physiol. Biochem.*, 3 (4): 191-201.
- LANE, R. and C. KHOLER. 2006. Effects of dietary lipid and fatty acids on white bass reproductive performance, egg hatchability, and overall quality of progeny. *N. Am. J. Aquacult.*, 68(2): 141-150.
- LAUVENS, P., E. LEBEGUE, H. JAUNET, A. BRUNEL, P. DHERT and P. SORGELOOS. 1999. Effect of dietary essential fatty acids and vitamins on egg quality in turbot broodstocks. *Aquacult. Int.*, 7(4): 225-240.
- LEBOULANGER, J., 1977. Les vitamines. Biochimie. Mode d'action intérêt thérapeutique. Ed. Roche, Neuilly-sur-Seine, France, 194 pp.
- LEE, K. and K. DABROWSKI. 2004. Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquaculture*, 230 (1-4): 377-389.
- LEHNINGER, A.L., D.L. NELSON and M.M. COX. 1993. Principles of Biochemistry, 2nd Edition, New York: Worth Publishers. pp. 542-571.
- LERAY, C. and X. PELLETIER. 1985. Fatty acid composition of trout phospholipids: Effect of (n-3) essential fatty acid deficiency. *Aquaculture*, 50 (1-2): 51-59.
- LI, Y., W. CHEN, Z. SUN, J. CHEN and K. WU. 2005. Effects of n-3 HUFA content in broodstock diet on spawning performance and fatty acid composition of eggs and larvae in *Plectorhynchus cinctus*. *Aquaculture*, 245:263-272.
- LIE, O., A. MANGOR-JENSEN and G.I. HEMRE. 1993. Broodstock nutrition in cod (*Gadus morhua*) effect of dietary fatty acids. *Fiskeridir. Skr., Ser. Emaer.*, 6: 11-19.



- LING, S., M. KUAH , T. MUHAMMAD , S. KOLKOVSKI and A.S.C. CHONG. 2006. Effect of dietary HUFA on reproductive performance, tissue fattyacid profile and desaturase and alongase mRNAs in female swordtail *Xiphophorus helleri*. *Aquaculture*, 261:204-214.
- LINK, J. and J. BURNETT. 2001. The relationship between stomach contents and maturity state for major northwest Atlantic fishes: new paradigms?. *J. Fish Biol.*, 59: 783-794.
- LUQUET, P. and T. WATANABE. 1986. Interaction «nutrition-reproduction» in fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 2 (1-4): 121-129.
- MA, Y., O.S. KJESBU and T. JORGENSEN. 1998. Effects of ration on the maturation and fecundity in captive Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 55 (4): 900-908.
- MADDEN, M. 2001. Vitamin A and the developing embryo. *Postgrad. Med. J.*, 77:489-491
- MAKINO, N., M. UCHIYAMA, S. IWANAMI, T. TOHYAMA and M. TANAKA. 1999. Developmental changes in multiple oil globules of Japanese sea bass eggs. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 65 (2): 268-277.
- MANGOR-JENSEN, A. and R.N. BIRKELAND. 1993. Effects of dietary carbohydrate on broodstock maturation and egg quality in cod. Milestone Rapp. Senter For Havbruk. *Inst. Mar. Res.*, 9, 14 pp.
- MANGOR-JENSEN, A., R.N. BIRKELAND and K. SANDNES. 1993. Effects of cod broodstock dietary vitamin C on embryonic growth and survival. Milestone. Rapp. Sent. Havbruk. *Inst. Mar. Res.*, 18, 8 pp.
- MANISSERY, J.K., D. KRISHNAMURTHY, B. GANGADHARA and M.C. NANDEESHA. 2001. Effect of varied levels of dietary protein on the breeding performance of common carp *Cyprinus carpio*. *Asian Fis. Sci.*, 14 (3): 317-323.
- MARTIN, N.V. 1970. Long-term effects of diet on the biology of the lake trout and the fishery in Lake Opeongo, Ontario. *J. Fish. Res. Board. Can.*, 27: 125-126.
- MATSUNARI, H., K. HAMADA, K. MUSHIAKE and T. TAKEUCHI. 2006. Effects of taurine levels in broodstock diet on reproductive performance of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fisheries Sci.*, 72: 955-960.
- MAZORRA, C., M. BRUCE, J.G. BELL, A. DAVIE, E. ALOREND, N. JORDAN, J. REES, N. PAPANIKOS, M. PORTERO and N. BROMAGE. 2003. Dietary lipid enhancement of broodstock reproductive performance and egg and larval quality in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture*, 227 (1-4): 21-33.
- McFADDEN, J.T., E.L. COOPER and J.K. ANDERSEN. 1965. Some effects of environment on egg production in brown trout (*Salmo trutta*). *Limnol. Oceanogr.*, 10 (1): 88-95.



- McKAY, I. and K.H. MANN, 1969. Fecundity of two cyprinid fishes in the River Thames, Reading, England. *J. Fish Res. Bd. Can.*, 26: 2795-2805.
- MEINELT, T., C. SCHULZ, M. WIRTH, H. KÜRZINGER and C. STEINBERG. 1999. Dietary fatty acid composition influences the fertilization rate of zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan). *J. Appl. Ichthyol.*, 15: 19-23.
- MERCURE, F. and G. VAN DER KRAAK. 1995. Inhibition of gonadotropin stimulated ovarian steroid production by polyunsaturated fatty acids in teleost fish. *Lipids*, 30: 547-554.
- METCOFF, J. 1986. Intracellular amino acid levels as predictors of protein synthesis. *J. Am. Coll. Nutr.*, 5 (2): 107-20.
- MIKI, W., K. YAMAGUCHI, S. KONOSU and T. WATANABE. 1984. Metabolism of dietary carotenoids in eggs of red sea bream. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77 B (4): 665-668.
- MIRONOVA, N.V. 1977. Energy expenditure on egg production in young *Tilapia mossambica* and the influence of maintenance conditions on their reproductive intensity. *J. Ichthyol.*, 17(4): 627-633.
- MOORE, P.K. 1985. Prostanoids: pharmacological, physiological and clinical relevance. Cambridge Univ. Press, Cambridge. 263 pp.
- MOREHEAD, D.T., P.R. HART, G.A. DUNSTAN, M. BROWN and N.W. PANKHURST. 2001. Differences in egg quality between wild striped trumpeter (*Latris lineata*) and captive striped trumpeter that were fed different diets. *Aquaculture*, 192 (1): 39-53.
- MOURENTE, G. and J.M. ODRIÓZOLA. 1990. Effect of broodstock diets on lipid classes and their fatty acid composition in eggs of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Physiol. Biochem.*, 8 (2): 93-101.
- MOURENTE, G., M.A. CARRASCOSA, C. VELASCO, J.M. ODRIÓZOLA, R. BILLARD and N. DE PAUW. 1989. Effect of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) broodstock diets on egg lipid composition and spawning quality. *Aquaculture Europa* 89. *Special Publication, European Aquaculture Society*, 10: 179-180.
- MUKHOPADHYAY, P.K., D.N. CHATTOPADHYAY and G. MITRA. 2003. Broodstock nutrition, the key to quality seed production. *Infofish International*, 3: 25-3.
- MUSHIAKE, K., S. ARAI, A. MATSUMOTO, H. SHIMMA and I. HASEGAWA. 1993. Artificial insemination from 2 year old cultured yellowtail fed with moist Pellets. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 59 (10): 1721-1726.
- MUSTAFA, T. and K.C. SRIVASTAVA. 1989. Prostaglandins (eicosanoids) and their role in ectothermic organisms. *Adv. Comp. Env. Physiol.*, 5: 157-207.
- NANDI, S., D.N. CHATTOPADHYAY, J.P. VERMA, S.K. SARKAR and P. K. MUKHOPADHYAY. 2001. Effect of dietary supplementation of fatty acids and vitamins



- on the breeding performance of carp *Catla catla*. *Reprod. Nutr. Develop.*, 41(4):365-375.
- NASSOUR, I. and C.L. LEGER. 1989. Deposition and mobilisation of body fat during sexual maturation in female trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquat. Living Resour.*, 2 (3): 153-159.
- NAVAS, J., M. THRUSH, J. RAMOS, M. BRUCE, M. CARRILLO, S. ZANUY and N. BROMAGE. 1996. The effect of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). In Goetz, F. W. and Thomas, P., eds. *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*. Austin, Texas, USA: Fish Symposium '95, Austin, pp. 108-110.
- NAVAS, J.M., M. BRUCE, M. TRUSH, B.M. FARNDAL, N. BROMAGE, S. ZANUY, M. CARRILLO, J.G. BELL and J. RAMOS. 1997. The impact of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass. *J. Fish Biol.*, 51: 760-773.
- NAVAS, J.M., M. THRUSH, S. ZANUY, J. RAMOS, N. BROMAGE and M. CARRILLO. 2001. Total lipid in the broodstock diet did not affect fatty acid composition and quality of eggs from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Sci. Mar.*, 65 (1):11-19.
- NRC (National Research Council). 1993. Nutrient requirements of fish. National Academic Press. Washington D. C. 144pp.
- OMNES, M. H., S. RECEK, H. BARONE, H. LE DELLIU, A. SCHMITZ, A. MUTELET, M. SUQUET and J. H. ROBIN. 2004. Influence of dry diets on reproductive performance and egg lipid composition during the first spawning season of captive pollack. *J. Fish Biol.*, 65 (Supplement A):326-336.
- PALACE, V. P. and J. WERNER. 2006. Vitamins A and E in the maternal diet influence egg quality and early life stage development in fish: a review. Recent Advances in the Study of Fish Eggs and Larvae. M.P. Olivar and J.J. Govoni (eds.). *Sci. Mar.* 70 (Suppl. 2): 41-57.
- PAPANIKOS, N. 2005. Egg quality of red snapper *Lutjanus campechanus*, significance of spawning method and broodfish nutrition *Diss. Abts. Int. Pt. B.*, 65(11), p. 5472.
- PARRISH, C.C., J.D. CASTELL, J.A. BROWN, L. BOSTON, J.S. STRICKLAND and D.C. SOMMERTON. 1994. Fatty acid composition of Atlantic halibut eggs in relation to fertilization *Bull. Aquacult. Assoc. Canada*, 942 (2): 36-38.
- PEREIRA, J.B., M.A. REIS-HENRIQUES, J.L. SANCHEZ and J.M. COSTA. 1998. Effect of protein source on the reproductive performance of female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquac. Res.*, 29 (10): 751-760.



- PICKOVA, J., P.C. DUTTA, P.O. LARSSON and A. KIESSLING. 1997. Early embryonic cleavage pattern, hatching success and egg-lipid fatty acid composition: comparison between two cod stocks. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 54: 2410-2416.
- PICKOVA, J., E. BRÄNNÄS and T. ANDERSSON. 2007. Importance of fatty acids in broodstock diets with emphasis on Arctic char (*Salvelinus alpinus*) eggs. *Aquacult. Int.* 15:305-311.
- RAINUZZO, J.R. 1993. Fatty acid and lipid composition of fish egg and larvae. *Proceedings of the First International Conference on Fish Farming Technology*, Trondheim, Norway, pp. 43-49.
- RAINUZZO, J.R., K.I. REITAN and Y. OLSEN. 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 155: 105-118.
- RAITT, D. F. S. 1968. The population dynamics of the Norway pout in the North Sea. *Mar. Res.*, 5: 1-23.
- RIDELMAN, J.M. 1981. Effects of starvation and diet formulation on ovarian development and egg viability of steelhead x rainbow trout hybrids. M.Sc. Thesis, University of Washington, Seattle, WA. 84 pp.
- ROBAINA, L., M.S. IZQUIERDO, F.J. MOYANO, J. SOCORRO, J.M. VERGARA, D. MONTERO and H. FERNÁNDEZ-PALACIOS. 1995. Soybean and lupin seed meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): Nutritional and histological implications. *Aquaculture*, 130: 219-233.
- ROBB, A.P. 1982. Histological observations on the reproductive biology of the haddock, *Melanogrammus aeglefinus* (L.). *J. Fish Biol.*, 20 (4): 397-408.
- RODRIGUEZ, C., J.R. CEJAS, M.V. MARTIN, P. BADIA, M. SAMPER and A. LORENZO. 1998. Influence of n-3 highly unsaturated fatty acid deficiency on the lipid composition of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) and on egg quality. *Fish Physiol. Biochem.*, 18 (2): 177-187.
- RØNNESTAD, I. 1992. Utilization of free amino acids in marine fish eggs and larvae. Tesis Doctoral, Univeridad de Bergen, Noruega.
- RØNNESTAD, I., H.J. FYHN and K. GRAVNINGEN. 1992. The importance of free aminoacids to the energy metabolism of eggs and larvae of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Mar. Biol.*, 114: 517-525.
- ROSENBLUM, P., H. HORNE, G. GARWOOD, T. BRANDT and B. VILLARREAL. 1995. Delayed ovarian development and reduced fecundity in largemouth bass raised on a pelleted feed containing high levels of steroids and low levels of archidonic acid. *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, The University of Texas, Austin (USA), p. 138
- SANDNES, K. 1991. Vitamin C in fish nutrition a review. *Fiskeridir. Skr., Ser. Emaer.*, 4: 3-32.



- SANDNES, K., Y. ULGENES, O.R. BRAEKKAN and F. UTNE. 1984. The effect of ascorbic acid supplementation in broodstock feed on reproduction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 43: 167-177.
- SANTIAGO, C.B. and O.S. REYES. 1993. Effect of dietary lipid source on reproductive performance and tissue lipid levels of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) broodstock. *J. Appl. Ichthyol.*, 9: 33-40.
- SANTIAGO, C. B. and A. C. GONZAL. 2000. Effect of preparad diet and vitamins A, E and C supplementation on the reproductive performance of cage-reared bighead carp *Aristichthys nobilis* (Richardson). *J. Appl. Ichthyol.* 16: 8-13.
- SARGENT, J.R. 1995. Origin and functions of eggs lipids: nutritional implications. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, London, pp. 353-372.
- SARGENT, J., G. BELL, M. V. BELL, J. HENDERSON and D. ROCHER. 1993. The metabolism of phospholipids and polyunsaturated fatty acids in fish. In: LAHLON, B. VITIELLO, P. (Eds.) *Aquaculture: Fundamentals and applied Research*. Coastal and Estuarine Studies 43, American Geophysical Union, Washington D.C., pp. 103-124.
- SARGENT, J., L. MCEVOY, A. ESTEVEZ, G. BELL, M. BELL, J. HENDERSON and D. TOCHER. 1999. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179 (1-4): 217-229.
- SASAYAMA, Y. and H. TAKAHASHI. 1972. Effect of starvation and unilateral astration in male goldfish, *Carassius auratus*, and a design of bioassay for fish gonadotropin using starved goldfish. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.*, 22: 267-283.
- SCABINI, V., H. FERNANDEZ-PALACIOS, and M.S. IZQUIERDO. 2006. Inclusion of carotenoids in broodstock diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., 1758): Effects on egg and spawning quality. Abstracts, XII International Symposium Fish Nutrition & Feeding Biarritz, France.
- SCHIMITTOU, H.R. 1993. High density fish culture in low volume cages. M.I.T.A. (P) No. 518, vol AQ41, 75 pp.
- SHIRANEE, P. and P. NATARAJAN. 1996. Crude palm oil as a source of carotenoids and tocopherols to enhance reproductive potential in pearlspot *Etroplus suratensis*. *Asian Fish. Sci.*, 9 (1): 35-44.
- SIDDIQUI, A.Q., A.H. AL-HARBI and Y.S. AL-HAFEDH. 1997. Effects of food supply on size at first maturity, fecundity and growth of hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) x *Oreochromis aureus* (Steindachner), in outdoor concrete tanks in Saudi Arabia. *Aquac. Res.*, 28 (5): 341-349.
- SIDDIQUI, A.Q., Y.S. AL-HAFEDH and S.A. ALI. 1998. Effect of dietary protein level on the reproductive performance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquac. Res.*, 29 (5): 349-358.



- SILVEIRA, R., J. PEREZ, E. FAJER and A. FRANCO. 1996. Effect of the vitamins supplement on the reproduction performance of *Ictalurus punctatus*. *Rev. Cub. Invest. Pesq.*, 20 (2):28-30.
- SIMAN, C.M. and U.J. ERIKSSON. 1997. Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes*, 46: 1054-1061.
- SIVALOGANATHAN, B., J. WALFORD and T.J. LAM. 1998. Free aminoacids and energy metabolism in eggs and larvae of sea bass, *Lates calcarifer*. *Mar. Biol.*, 131: 695-702.
- SOHN, Y.C., H. SUETAKE, Y. YOSHIURA, M. KOBAYASHI and K. AIDA. 1998. Structural and expression analysis of gonadotropin I-beta subunit genes in goldfish (*Carassius auratus*). *Gene*, 222, 257-267.
- SOLIMAN, A. X., K. JAUNCEY and R.J. ROBERTS. 1986. The effect of dietary ascorbic acid supplementation on hatchability, survival rate and fry performance in *Oreochromis niloticus* (Peters). *Aquaculture*, 59: 197-208.
- SORENSEN, P.W. and F.W. GOETZ. 1993. Pheromonal function of prostaglandin metabolites in teleost fish. *J. Lipid Mediat.*, 6: 385
- SORENSEN, P.W., T.J. HARA, N.E. STACEY and F.W. GOETZ. 1988. F prostaglandins function as potent stimulants that comprise the post-ovulatory female sex pheromone in goldfish. *Biol. Reprod.*, 39: 1039-1050.
- SPRINGATE, J.R.C., N.R. BROMAGE and P.R.T. CUMARANATUNGA. 1985. The effects of different ration on fecundity and egg quality in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). In: Cowey, CB; Mackie, AM; Bell, JG (eds). *Int. Symp. on Feeding and Nutrition in Fish*, Aberdeen (UK), pp. 371-393
- SRIVASTAVA, R.K. and J.A. BROWN. 1992. Assessment of egg quality in Atlantic salmon, *Salmo salar*, treated with testosterone-II. Amino acids. *Comp. Biochem. Physiol.* 103 A: 397-402.
- SRIVASTAVA, R.K., J.A. BROWN and F. SHAHIDI. 1995. Changes in the amino acid pool during embryonic development of cultured and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 131: 115-124.
- STACEY, N.E. and F.W. GOETZ. 1982. Role of prostaglandins in fish reproduction. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39: 92-98.
- STAUFFER, T.M. 1976. Fecundity of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) from the Great Lakes and a comparison with ocean salmon. *J. Fish. Res. Board Can.*, 33 (5): 1150-1155.
- SULLIVAN, M.H.F. and B.A. COOKE. 1985. Effects of calmodulin and lipoxygenase inhibitors on LH and LHRH-agonist stimulated steroidogenesis in rat leydig cells. *Biochem. J.*, 232: 55-59.
- SUTJARITVONGSANON, S. 1987. Level of vitamin E content suitable for gonad developing and spawning of goldfish, *Carassius auratus* (Linn.). Kasetsart Univ., Bangkok, Abstracts of Master of Science Theses Fisheries Science, *Notes Fac. Fish.*, no. 12, p.2.



- TACON, A.G. J. 1981. Speculative review of possible carotenoid function in fish. *Prog. Fish-Cult.*, 43 (4): 205-208.
- TACON, A.G. J. 1989. Nutricion y alimentacion de peces y camarones cultivados manual de capacitación. AQUILA II (GCP/RLA/102/ITA). FAO, Project reports - No.4. 592 pp.
- TAKEUCHI, T. 1997. Essential fatty acid requirements of aquatic animals with emphasis on fish larvae and fingerlings. *Rev. Fish. Sci.*, 5 (1): 1-25.
- TAKEUCHI, M., S. ISHII and T. OGISO. 1981a. Effect of dietary vitamin E on growth, vitamin E distribution, and mortalities of the fertilized eggs and fry in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res.*, 104: 111-122.
- TAKEUCHI, T., T. WATANABE, T. OGINO, M. SAITO, M. NISHIMURA and T. NOSE. 1981b. Effects of low protein-high calory diets and deletion of trace elements from a fish meal diet on reproduction of rainbow trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 47: 645-654.
- TAKEUCHI, T., Z. FENG, K. YOSEDA, J. HIROKAWA and T. WATANABE. 1994. Nutritive value of DHA enriched rotifer for larval cod. *Nippon Suisan Gakk.*, 60 (5): 641-652.
- TANDLER, A., T. WATANABE, S. SATOH and K. FUKUSHO. 1989. The effect of food deprivation on the fatty acid and lipid profile of red seabream larvae (*Pagrus major*). *Br. J. Nutr.*, 62: 349-361.
- TANDLER, A., M. HAREL, W.M. KOVEN and S. KOLKOVSKI. 1995. Broodstock and larvae nutrition in gilthead seabream *Sparus aurata* new findings on its mode involvement in improving growth, survival and swimbladder inflation. *Isr. J. Aquacul.-Bamid.*, 47 (3-4): 95-111.
- THORSEN, A., E.A. TRIPPEL and Y. LAMBERT. 2003. Experimental methods to monitor the production and quality of eggs of captive marine fish. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, 33: 55-70.
- TOCHER, D.R. and D.G. HARVIE. 1988. Fatty acid compositions of the major phosphoglycerides from fish neural tissues; (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and cod (*Gadus morhua*) brains and retinas. *Fish Physiol. Biochem.*, 5 (4): 229-239.
- TOCHER, D., A.J. FRASER, J.R. SARGENT and J.C. GAMBLE. 1985a. Fatty acid composition of phospholipids and neutral lipids during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids*, 20 (2): 69-74.
- TOCHER, D., A.J. FRASER, J.R. SARGENT and J.C. GAMBLE. 1985b. Lipid class composition during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids*, 20 (2): 84-89.
- TORRISSEN, O.J. 1984. Pigmentation of salmonids effects of carotenoids in eggs and start feeding diet on survival and growth rate. *Aquaculture*, 43: 185-193.
- TORRISSEN, O.J. 1990. Biological activities of carotenoids in fishes. In: Takeda, M., Watanabe, T. (Eds.), *The Current Status of Fish Nutrition in Aquaculture*. Japan Translation Center, Tokyo, Japan, pp. 387-399.



- TORRISSEN, O.J. and R. CHRISTIANSEN. 1995. Requirements for carotenoids in fish diets. *J. Appl. Ichthyol.*, 11: 225-230.
- TOWNSHEND, T.J. and R.J. WOOTTON. 1984. Effects of food supply on the reproduction of the convict cichlid, *Cichlasoma nigrofasciatum*. *J. Fish Biol.*, 24 (1): 91-104.
- TRIPPEL, E.A., J. J. HUNT, and M.I. BUZETA. 1995. Evaluation of the cost of reproduction of Georges Bank Atlantic cod (*Gadus morhua*) using otolith back calculation. In: *Recent developments in fish otolith research*. D. H. Secar, J. M. Dean, and S. E. Campana (eds.). University of South Carolina Press, Columbia, SC, p. 599-616.
- TVERANGER, B. 1986. Effect of pigment content in broodstock diet on subsequent fertilization rate, survival and growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) offspring. *Aquaculture*, 53: 85-93.
- VASSALLO-AGIUS, R., H. IMAIZUMI, T. WATANABE, T. YAMAZAKI, S. SATOH and V. KIRON. 2001a. The influence of astaxanthin supplemented dry pellets on spawning of striped jack. *Fisheries Sci.*, 67: 260-270.
- VASSALLO-AGIUS, R., H. IMAIZUMI, T. WATANABE, T. YAMAZAKI, S. SATOH and V. KIRON. 2001b. Effect of squid meal in dry pellets on the spawning performance of striped jack *Pseudocaranx dentex*. *Fisheries Sci.*, 67: 271-280.
- VASSALLO-AGIUS, R., T. WATANABE, G. YOSHIZAKI, S. SATOH and Y. TAKEUCHI. 2001c. Quality of eggs and spermatozoa of rainbow trout fed an n-3 essential fatty acid deficient diet and its effects on the lipid and fatty acid components of eggs, semen and livers. *Fisheries Sci.*, 67 (5): 818-825.
- VERAKUNPURIYA, V., T. WATANABE, K. MUSHIAKE, V. KIRON, S. SATOH and T. TAKEUCHI. 1996. Effect of broodstock diets on the chemical components of milt and eggs produced by yellowtail. *Fisheries Sci.*, 62 (4): 610-619.
- VERAKUNPURIYA, V., K. MUSHIAKE, K. KAWANO and T. WATANABE. 1997. Supplemental effect of astaxanthin in broodstock diets on the quality of yellowtail eggs. *Fisheries Sci.*, 63(5): 816-823.
- VERGARA, J.M.. 1992. Studies on the utilization of dietary protein and energy by gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Tesis Doctoral, Universidad de Stirling, Reino Unido. 162 pp.
- VLADYKOV, V.D. 1956. Fecundity of wild speckled trout (*Salvelinus fontinalis*) in Quebec lake. *J. Fish. Res. Board Can.*, 13: 779-841.
- WADE, M.G., G. VAN DER KRAAK, M.F. GERRITS and J.S. BALLANTYNE. 1994. Release and steroidogenic actions of polyunsaturated fatty acids in fuge goldfish testis. *Biol. Reprod.*, 51: 131-139.
- WASHBURN, B.S., D.J. FRYE, S.S.O. HUNG, S.I. DOROSHOV and F.S. CANTE. 1990. Dietary effects on tissue composition, oogenesis and the reproductive perfor-



- mance of female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 90: 179-195.
- WATANABE, T. 1982. Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73 (1): 3-15.
- WATANABE, T. 1990. Effect of broodstock diets on reproduction of fish. *Actes Colloq. IFREMER*, 9: 542-543.
- WATANABE, T. 1993. Importance of docosahexanoic acid in marine larval fish. *J. World. Aquacult. Soc.*, 24: 152-161.
- WATANABE, T. and V. KIRON. 1994. Prospects in larval fish dietetics. *Aquaculture*, 124: 223-251.
- WATANABE, T. and KIRON, V. 1995. Broodstock management and nutritional approaches for quality offsprings in the Red Sea Bream. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 424 pp.
- WATANABE, T. and F. TAKASHIMA. 1977. Effect of alpha-tocopherol deficiency on carp. 6. Deficiency symptoms and changes of fatty acid and triglyceride distributions in adult carp. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 43 (7): 819-830.
- WATANABE, T., T. ARAKAWA, C. KITAJIMA and S. FUJITA. 1984a. Effect of nutritional quality of broodstock diet on reproduction of red seabream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50 (3): 495-501.
- WATANABE, T., A. ITOH, A. MURAKAMI, Y. TSUKASHIMA, C. KITAJIMA and S. FUJITA. 1984b. Effect of nutritional composition of diets on chemical components of red seabream broodstocks and eggs produced. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50 (3): 503-515.
- WATANABE, T., A. ITOH, A. MURAKAMI, Y. TSUKASHIMA, C. KITAJIMA and S. FUJITA. 1984c. Effect of nutritional quality of diets given to broodstock on the verge of spawning on reproduction of red seabream. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50 (6): 1023-1028.
- WATANABE, T., T. TAKEUCHI, M. SAITO and K. NISHIMURA. 1984d. Effect of low protein-high calorie or essential fatty acid deficiency diet on reproduction of rainbow trout. *Nippon Suisan Gakk.*, 50 (7): 1207-1215.
- WATANABE, T., A. ITOH, C. KITAJIMA and S. FUJITA, , 1984e. Effect of protein levels on reproduction of red sea bream. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 50 (6): 1015-1022.
- WATANABE, T., A. ITOH, S. SATOH, C. KITAJIMA and S. FUJITA. 1985a. Effect of dietary protein levels and feeding period before spawning on chemical components of eggs produced by red sea bream broodstock. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51 (9): 1501-1509.
- WATANABE, T., T. KOIZUMI, H. SUZUKI, S. SATOH, T. TAKEUCHI, N. YOSHIDA, T. KITADA and Y. TSUKASHIMA. 1985b. Improvement of quality of red sea bream eggs by fee-



- ding broodstock on a diet containing cuttlefish meal or on raw krill shortly before spawning. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 51 (9): 1511-1521.
- WATANABE, T., M. S. IZQUIERDO, T. TAKEUCHI, S. SATOH and C. KITAJIMA. 1989. Comparison Between Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids in terms of essential fatty Acid efficacy in Larval Red Seabream. *Nippon Suisan Gakk.*, 55(9):1635-1640.
- WATANABE, T., M.J. LEE, J. MIZUTANI, T. YAMADA, S. SATOH, T. TAKEUCHI, N. YOSHIDA, T. KITADA and T. ARAKAWA. 1991a. Nutritional studies in the seed production of fish. 20. Effective components in cuttlefish meal and raw krill for improvement of quality of red seabream *Pagrus major* eggs. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 57: 681-694.
- WATANABE, T., T. FUJIMURA, M.J. LEE, K. FUKUSHO, S. SATOH and T. TAKEUCHI. 1991b. Nutritional studies in the seed production of fish. 21. Effect of polar and nonpolar lipids from krill on quality of eggs of red seabream *Pagrus major*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 57: 695-698.
- WOODWARD, B. 1994. Dietary vitamin requirements of cultured young fish, with emphasis on quantitative estimates for salmonids. *Aquaculture*, 124 (1-4): 133-168.
- WOOSTER, G.A. and BOWSER, P.R. 2000. Remediation of Cayuga Syndrome in landlocked Atlantic Salmon *Salmo salar* using egg and sac fry bath treatments of thiamin hydrochloride. *J. World Aquacult. Soc.*, 31: 149-157.
- WOOTTON, R.J. 1979. Energy costs of egg production and environmental determinants of fecundity in teleost fishes. *Symp. Zool. soc. Lond.*, 44: 133-159.
- YONEDA, M. and P. J. WRIGH. 2005. Effects of varying temperature and food availability on growth and reproduction in first-time spawning female Atlantic cod. *J. Fish Biol.*, 67: 1225-1241.
- XIAO, W., Y. LIU, L. TIAN, W. ZHEN and J. CAO. 2003. Effect of vitamin E and vitamin C on spawning quality of broodstock for grouper *Epinephelus coioides* *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*. 42 (Suppl.2): 214-217.
- ZHANG, L., B. BENSON and J.L. LOGAN. 1992. Dietary fish oil delays puberty in female rats. *Biol. Reprod.*, 47: 998-1003.
- ZOHAR, Y., M. HAREL, S. HASSIN and A. TANDLER. 1995. Gilthead seabream. In: Bromage, N. R., Roberts, R.J. (Eds.) *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell Science, London, pp. 94-117.

6

MECANISMOS MOLECULARES DURANTE LA MADURACIÓN Y OVULACIÓN DEL OOCITO DE TELEÓSTEOS: AVANCES RECIENTES Y SU APLICACIÓN EN ACUICULTURA



MECANISMOS MOLECULARES DURANTE LA MADURACIÓN Y OVULACIÓN DEL OOCITO DE TELEÓSTEOS: AVANCES RECIENTES Y SU APLICACIÓN EN ACUICULTURA

Joan Cerdà

Laboratorio IRTA-Instituto de Ciencias del Mar de Barcelona (CSIC) y Centro de Acuicultura-IRTA

Resumen

La piscicultura moderna se basa en tecnologías para el control de la reproducción que deben ser eficaces para predecir el momento y la calidad de la progenie. Estas tecnologías requieren por tanto un buen conocimiento de los procesos biológicos implicados. Durante los últimos 20 años un gran número de estudios sobre los mecanismos endocrinos que controlan la reproducción de teleósteos ha permitido el desarrollo de protocolos para la inducción de la puesta en cautividad en muchas especies. Sin embargo, los procesos moleculares implicados en la maduración, hidratación y ovulación de los oocitos son más desconocidos, a pesar de que estos ejercen una influencia directa sobre la supervivencia de huevos y embriones. En este capítulo se resume el conocimiento actual sobre los mecanismos celulares y moleculares durante la maduración del oocito, incluyendo la producción de los esteroides inductores de la maduración y la activación del factor promotor de la maduración en el oocito, y posterior ovulación. Asimismo, se analizan estudios re-



cientes que han descubierto por primera vez la base molecular del proceso de hidratación del oocito de teleósteos marinos, lo cual contribuye directamente a la flotabilidad de los huevos de estas especies. Aunque nuestro conocimiento es todavía muy limitado, la identificación de moléculas y vías metabólicas esenciales para la correcta maduración e hidratación del oocito puede contribuir al desarrollo de nuevas tecnologías para acuicultura, como en la evaluación de la viabilidad de los huevos y la preservación a largo plazo de gametos femeninos.

Abstract

Modern fish culture is based on technologies for the control of reproduction that must allow to predict the timing and quality of spawnings. These technologies, therefore, require a good knowledge of the biological processes implicated. During the past 20 years, a high number of studies concerning the endocrine mechanisms controlling the production of eggs has allowed the development of protocols for spawning induction of captive broodfish. However, much less is known on the molecular events involved in the maturation, hydration and ovulation of fish oocytes, which have a direct influence on egg and early embryo survival. In this chapter, we summarize the current knowledge on the cellular and molecular mechanisms during fish oocyte maturation, including the production of maturation-inducing steroids and the activation of the maturation-promoting factor in the oocyte, and further ovulation. Recent findings that have uncovered for the first time the molecular basis of the process of oocyte hydration in marine teleosts, that directly contributes to the buoyancy of the eggs, will be also reviewed. Although our knowledge is still very limited, the identification of molecules and pathways essential for oocyte maturation and hydration in teleosts will contribute to the development of new technologies for the evaluation of egg viability and the long term preservation of gametes and eggs for aquaculture.

6.1. INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos importantes de la piscicultura actual es la búsqueda de nuevas especies de teleósteos aptas para el cultivo comercial con el fin de diversificar la producción de especies competitivas. No



obstante, para asegurar la producción industrial de alevines de cualquier especie se requiere una elevada producción de huevos y larvas de buena calidad. El desarrollo de métodos eficaces para el control de la reproducción de teleósteos es por tanto un factor crítico, el cual debe apoyarse en un buen conocimiento de los mecanismos fisiológicos implicados en la producción de gametos. Durante los últimos años se han llevado a cabo un gran número de investigaciones que han identificado los principales procesos hormonales implicados en el crecimiento y maduración gonadal en teleósteos. Estos estudios han hecho posible, por ejemplo, el desarrollo de protocolos para la inducción a la puesta en cautividad de bastantes especies. Sin embargo, son todavía poco conocidos los mecanismos moleculares y celulares implicados en la formación del huevo de teleósteos, los cuales tienen un enorme impacto sobre su viabilidad, y por tanto, sobre la «calidad» del huevo. Este capítulo pretende contribuir con una visión integrada del estado actual de conocimientos sobre los mecanismos de maduración, hidratación y ovulación del oocito de teleósteos, cuyo estudio supone un paso imprescindible para la optimización de las técnicas actuales de control de la reproducción y el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas en acuicultura.

6.2. CONTROL MOLECULAR DE LA MADURACIÓN DEL OOCITO

En vertebrados, incluyendo los teleósteos, los oocitos se producen inicialmente en el ovario después de la entrada en meiosis de las oogonias. Durante su diferenciación, los oocitos detienen el ciclo celular meiótico en profase I e inician el crecimiento mediante la incorporación y acumulación de diversas sustancias necesarias para la maquinaria del oocito y el futuro embrión. Estas sustancias son fundamentalmente compuestos fosfoglicoproteicos precursores del vitelo, las vitelogeninas (Vgs), así como lípidos, vitaminas y distintos ARN mensajeros (ARNm) (Wallace, 1985; Tyler y Sumpter, 1996). Este periodo de crecimiento del oocito se conoce también como vitelogénesis durante el cual los oocitos son todavía inmaduros e incapaces de ser fertilizados, incluso después de alcanzar la fase final de crecimiento. La estimulación



hormonal de los oocitos que ya han llegado a su máximo crecimiento activa la meiosis hasta metafase II, y esta queda otra vez detenida. Los oocitos en metafase II son maduros, y después de ser ovulados pueden ser fertilizados e iniciarse el desarrollo embrionario. La transición que sufren los oocitos desde profase I hasta metafase II se conoce como la maduración final del oocito o simplemente como maduración del oocito (Fig. 1).

Los oocitos sufren profundos cambios morfológicos durante el proceso de maduración, como la condensación de los cromosomas, la rotura de la vesícula germinal (núcleo del oocito) y la extrusión del primer corpúsculo polar que ocurre entre la metafase I y la metafase II. La vesícula germinal está inicialmente localizada en el centro del oocito, pero en respuesta a la estimulación hormonal esta migra hacia el polo animal del oocito y se disgrega. Por tanto, a medida que transcurre la maduración del oocito la vesícula germinal va desapareciendo, y ello normalmente se utiliza como un marcador visual de la maduración

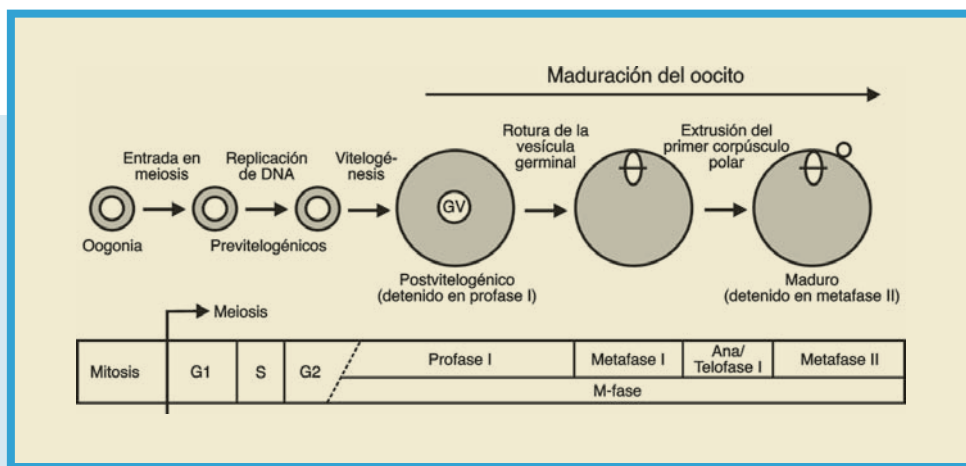


FIGURA 1.

Esquema del crecimiento y maduración del oocito. Los oocitos producidos a partir de la entrada en meiosis de las oogonias detienen el ciclo meiótico celular en la profase I y crecen de tamaño principalmente por la acumulación de vitelo (vitelogénesis). Los oocitos en profase I son inmaduros. En respuesta a la señal hormonal los oocitos inmaduros prosiguen la meiosis hasta la metafase II y son ya maduros. GV, vesícula germinal (núcleo del oocito) (modificado de Suwa y Yamashita, 2007).



(«germinal vesicle breakdown», GVBD). Estos procesos nucleares están asociados con otros cambios en el citoplasma del oocito, como es la fusión de los gránulos de vitelo, la clarificación del citoplasma, y en especies marinas, el aumento de tamaño del oocito debido a la hidratación (ver más adelante).

Durante las primeras fases de crecimiento y hasta la maduración en el ovario, el oocito se encuentra rodeado por un conjunto de células foliculares, llamadas células de la teca y de la granulosa, formando el folículo ovárico (Fig. 2). En el folículo se establecen una serie de estructuras celulares de contacto entre las células foliculares entre si y entre las células de la granulosa y el oocito. Estas estructuras son principalmente zonas adherentes y desmosomas, que intervienen en la for-

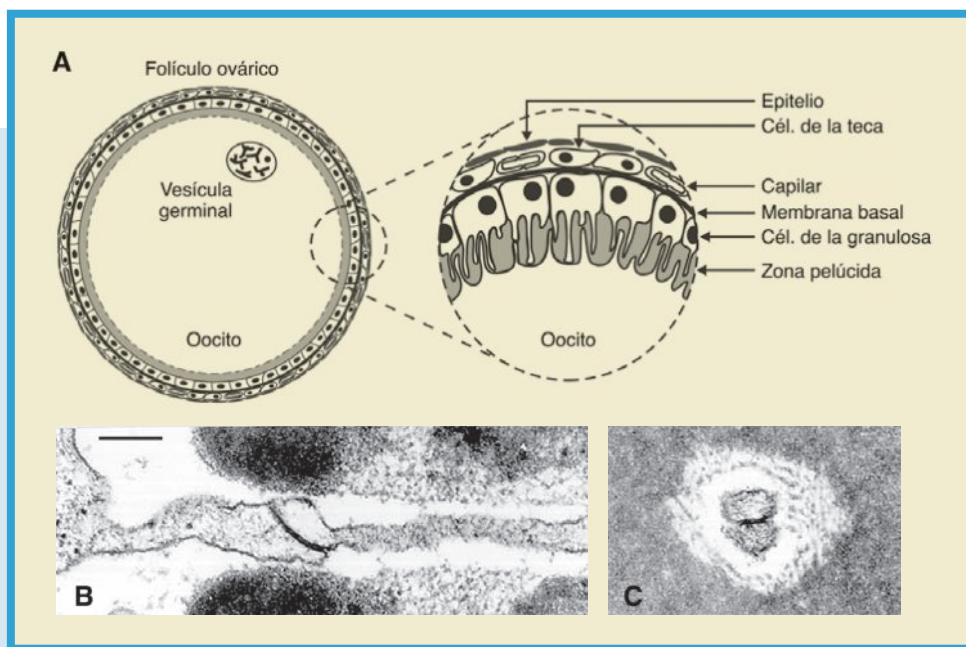


FIGURA 2.

A) Representación esquemática de la estructura del folículo ovárico de teleósteos en la que se muestra el oocito y las células foliculares que lo envuelven. **B, C)** Fotografías de microscopio electrónico de uniones íntimas entre las microvellosidades del oocito y las células de la granulosa que atraviesan la zona pelúcida en el pez cebra (**B**, sección longitudinal; **C**, sección transversal). Barra 0,25 μm .



mación y citoarquitectura del folículo, así como uniones íntimas («gap junctions») que permiten la comunicación química intercelular (Kobayashi, 1985; Cerdà *et al.*, 1999). La estrecha conexión intercelular en el folículo facilita la correcta coordinación de los diferentes mecanismos moleculares que regulan la maduración y ovulación del oocito.

6.2.1. Control de la parada meiótica en profase I

Durante todo el periodo de crecimiento del oocito la meiosis se encuentra detenida en profase I. Los mecanismos moleculares que conducen la parada meiótica todavía no han sido claramente definidos. En mamíferos y teleósteos se piensa que este mecanismo es iniciado en las células de la granulosa en contacto con el oocito mediante el envío de compuestos inhibitorios de la meiosis a través de las uniones íntimas (Fig. 2, B y C) (Vilain *et al.*, 1980; Cerdà *et al.*, 1993; Edry *et al.*, 2006). De este modo, la maduración espontánea del oocito puede ocurrir cuando se bloquea la comunicación entre el oocito y las células de la granulosa a través de las uniones íntimas (e.g., Cerdà *et al.*, 1993). Durante la estimulación hormonal el efecto inhibitorio de los compuestos sería superado por la señales activadas en el oocito para iniciar la maduración meiótica. Aunque la naturaleza bioquímica de estos agentes inhibidores de la meiosis no está clara ni en mamíferos ni teleósteos, puede que en este mecanismos estén implicadas proteínas G que estimulan la adenil ciclasa (Gs) así como la proteína quinasa A (PKA) cuya actividad está regulada por variaciones en la concentración intraoocítica de AMP cíclico (AMPc) y de ATP derivado del catabolismo de la glucosa (Hinckley *et al.*, 2005).

6.2.2. Regulación por gonadotropinas

La maduración del oocito es controlada por la acción sucesiva de tres sustancias principales: la hormona luteinizante (LH), secretada por la glándula pituitaria, el esteroide inductor de la maduración («maturation-inducing steroid», MIS) sintetizado y secretado por las células de la granulosa en respuesta a la LH, y el factor promotor de la maduración («maturation-promoting factor», MPF) producido y activado en el citoplasma del oocito después de la recepción del MIS. Al igual que



en mamíferos, los teleósteos poseen dos gonadotropinas (GTH), la hormona folículo estimulante («follicle-stimulating hormone», FSH) o GTH I y la LH o GTH II. La hormona FSH regula el crecimiento del oocito, mientras que la LH es la responsable de la activación de la maduración. Revisiones muy completas sobre la estructura, síntesis y función de las GTH de teleósteos pueden encontrarse en Oba *et al.* (2001) y Yaron *et al.* (2003).

6.2.3. Síntesis del MIS

La producción del MIS se inicia en las células foliculares que rodean al oocito en respuesta a la LH. En salmónidos, ciprinidos y espáridos, se han identificado dos progestágenos diferentes que actúan como MIS, el $17\alpha,20\beta$ -dihidroxi-4-pregnen-3-ona ($17,20\beta$ P) (Nagahama y Adachi, 1985) y el $17,20\beta,21$ -trihidroxi-4-pregnen-3-ona (20β S) (Thomas, 1994). No obstante, es posible que otros esteroides C_{21} o formas modificadas del $17,20\beta$ P puedan constituir el MIS natural en otras especies (Kime, 1993). Además, algunos de estos MIS puede también actuar como feromonas en algunas especies de teleósteos (Sorensen *et al.*, 2004).

El control endocrino de la síntesis del MIS se ha estudiado extensamente en la trucha arcoiris (*Onchorynchus mykiss*) y el salmón (*O. rhodurus*), y en base a estos estudios se ha propuesto el «modelo de dos células» (Young *et al.*, 1986; Fig. 3). Según este modelo, las células de la teca producen 17α -hidroxi-progesterona a partir de progesterona por la acción del enzima 17-hidroxilasa (P450c17), la cual atraviesa la membrana basal y es transformada en $17,20\beta$ P por las células de la granulosa. La producción de pregnenolona, precursor de progesterona, a partir de colesterol está catalizada por el enzima de rotura de la cadena lateral de colesterol (P450scc), y es transformada en progesterona por la enzima 3β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa (3β -HSD). En teleósteos, al igual que en mamíferos, la proteína reguladora de la esteroideogénesis aguda (StAR) podría estar implicada en la transferencia de colesterol a la mitocondria, donde se encuentra la P450scc (Nakamura *et al.*, 2005; Ings y van der Kraak, 2006). La enzima 20β -hidroxi-esteroide deshidrogenasa (20β -HSD), sintetizada de novo por las células de la granulosa en respuesta a la LH, es la responsa-



ble de la producción de 17,20 β P a partir de 17 α -hidroxi-progesterona (Nagahama, 1997; Planas *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2002). El aumento de los niveles de AMPc en las células de la granulosa como resultado de la activación del receptor de LH parece que controla la síntesis de 20 β -HSD (Nagahama, 1997), aunque los mecanismos moleculares específicos implicados no son bien conocidos. El modelo de dos células de salmónidos, no obstante, no puede aplicarse a todas las especies de teleósteos, ya que se ha visto que en algunas especies la producción de 17,20 β P por las células de la granulosa no requiere de la síntesis de precursores por las células de la teca (Onitake y Iwamatsu, 1986; Petrino *et al.*, 1989).

Durante la esteroideogénesis, la 17 α -hidroxi-progesterona puede ser transformada en androstenediona también por el enzima P450c17, y esta a su vez en testosterona por el enzima 17 β -hidroxi-esteroide dehidrogenasa (17 β -HSD) (Fig. 3). La testosterona puede ser entonces catalizada a 17 β -estradiol en las células de la granulosa por la enzima P450arom. Esta vía metabólica es la que parece que ocurre durante el crecimiento del oocito, donde el estradiol producido por las células de la granulosa es secretado a la corriente sanguínea para estimular la síntesis de Vg en el hígado (Nagahama, 1994). Por tanto, durante la maduración del oocito existe un cambio en las vías esteroideogénicas del folículo ovárico, donde la producción de andrógenos y estrógenos se suprime y se activa la síntesis de progestágenos y la producción del MIS. Este cambio podría estar regulado por los niveles relativos intracelulares de P450c17 y 3 β -HSD (Sakai *et al.*, 1994). De este modo, cuando la actividad de P450c17 es dominante sobre la de 3 β -HSD se favorece la síntesis de estrógenos, mientras que cuando la actividad de 3 β -HSD es la predominante, mediante la reducción de ARNm de P450c17 (Ohta y Matsuyama, 2002; Bobe *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2005) o por cambios bioquímicos que afectan ambas actividades enzimáticas, se favorece la síntesis de 17,20 β P (Sakai *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2005). Además, los niveles de ARNm y de actividad de la P450arom también disminuyen al finalizar la vitelogénesis lo que disminuye la producción de estradiol (Young *et al.*, 1983; Tanaka *et al.*, 1992; Kumar *et al.*, 2000; Gen *et al.*, 2001; Bobe *et al.*, 2004).

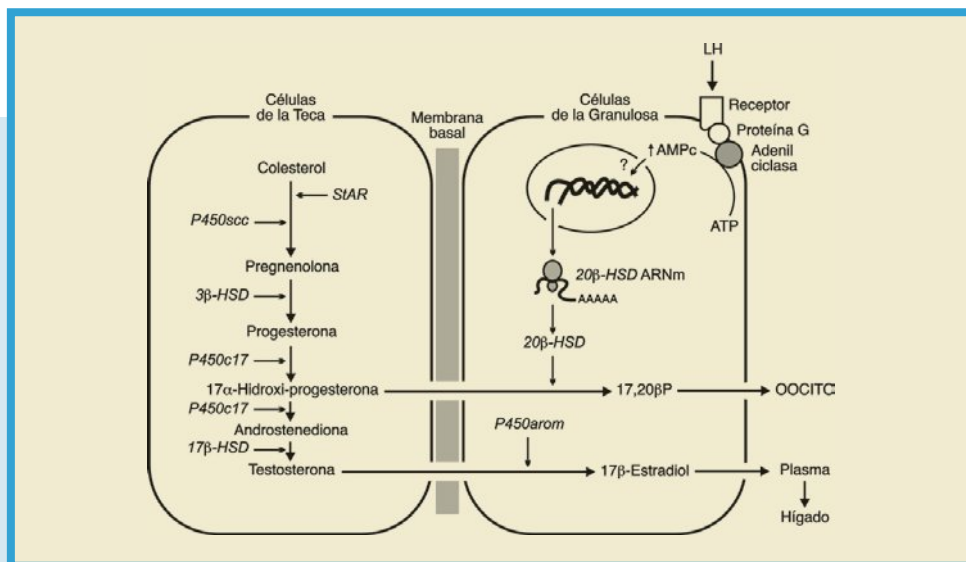


FIGURA 3.

Vías metabólicas para la producción de esteroides sexuales y del esteroide inductor de la maduración (MIS) según el modelo de dos células de salmónidos (Nagahama et al., 1997). En este modelo se indica la contribución específica de las células de la teca y de la granulosa. StAR, proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda; 3β-HSD, 3β-hidroxi-esteroide dehidrogenasa; P450scc, enzima de rotura de la cadena lateral de colesterol; P450c17, 17-hidroxilasa; P450arom, aromatasa; 20β-HSD, 20β-hidroxi-esteroide dehidrogenasa; 17β-HSD, 17β-hidroxi-esteroide dehidrogenasa. Modificado de Nagahama (1994).

6.2.4. El receptor del MIS y mecanismo de transducción de señal

Aunque existen muchas evidencias indirectas de la presencia de un receptor de membrana para el MIS en el oocito de teleósteos y anfibios, su entidad bioquímica ha permanecido desconocida durante mucho tiempo. Recientemente, sin embargo, ha sido identificado y caracterizado un receptor de membrana de progestágenos en el oocito de peces que podría ser el receptor del MIS (Zhu *et al.*, 2003ab; Tokumoto *et al.*, 2006). Este receptor, el cual posee las características estructurales típicas de un receptor unido a proteínas G, es posiblemente el mediador de los efectos no genómicos de progestágenos en el oocito. No obstante, el mecanismo por el



cual la señal activada por este receptor es transmitida al citoplasma del oocito, donde se forma y se activa el MPF, no es bien conocido. Se ha sugerido que en la membrana del oocito el receptor del MIS está asociado a la proteína G sensible a la toxina de *Pertussis* inhibidora de la adenil ciclase (Gi) (Yoshikuni y Nagahama, 1994; Oba *et al.*, 1997; Pace y Thomas, 2005), aunque estudios en anfibios indican que la inhibición de la Gs es la señal que inicia la maduración meiótica (Wang y Liu, 2004). En cualquier caso, parece claro que la activación del MIS disminuye los niveles intracelulares de AMPc en el oocito, posiblemente mediante la inhibición de la adenil ciclase, lo que llevaría a reducir la actividad de la PKA (e.g., Jalabert y Finet, 1986; DeManno y Goetz, 1987ab; Finet *et al.*, 1988; Cerdà *et al.*, 1998; Haider, 2003) (Fig. 4).

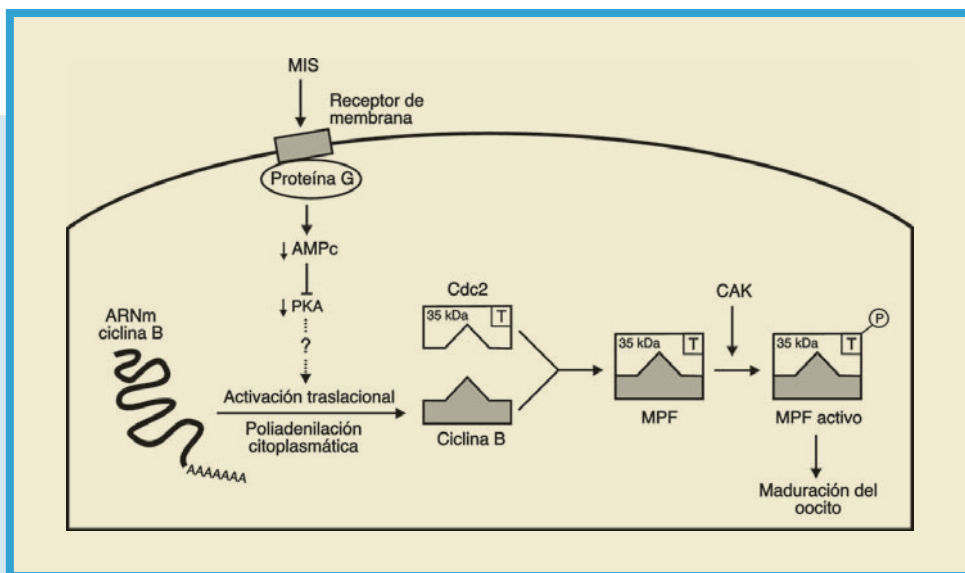


FIGURA 4.

Formación y activación del MPF a través de la transducción de señal iniciada por el MIS. Los oocitos inmaduros contienen Cdc2 monomérica. La ciclina B es sintetizada por activación traduccional de su ARNm mediante poliadenilación del extremo 3'. Después de la formación del complejo MPF, la subunidad Cdc2 es fosforilada en la treonina 161 por la proteína quinasadora de Cdk (CAK), lo que activará el MPF y estimulará la progresión de la meiosis en el oocito (modificado de Suwa y Yamashita, 2007).



Aunque el AMPc y la PKA posiblemente juegan un papel importante en la inducción de la maduración del oocito, los mecanismos intracelulares involucrados a partir de la inhibición de la PKA son todavía desconocidos. Recientemente se ha sugerido que en oocitos de carpa dorada (*Carassius auratus*) una proteasa extra-lisosomal, llamada «proteasome», la cual actúa sobre proteínas marcadas por unión con ubiquitina, podría estar involucrada en el mecanismo de transducción desde el MIS hasta la activación del MPF (Tokumoto *et al.*, 1997a, 2000; Horiguchi *et al.*, 2005). Esta proteasa parece intervenir en dos instantes, durante la migración de la vesícula germinal y justo antes de su rotura, cuando el MPF es activado (ver más adelante).

6.2.5. Formación y activación del MPF

La estimulación por el MIS conduce a la activación del MPF en el citoplasma del oocito, que es el responsable de la maduración. El MPF fue aislado por primera vez a partir de huevos no fertilizados de *Xenopus laevis*, y posteriormente ha sido también purificado y caracterizado en invertebrados y teleósteos (Yamashita *et al.*, 1992a). El complejo MPF está compuesto de dos subunidades distintas, la subunidad catalítica Cdc2 y la subunidad reguladora ciclina B. A diferencia de las hormonas gonadotropas y el MIS, el MPF no posee especificidad de especie, i.e., el MPF aislado de anfibios puede inducir la maduración del oocito de peces (Yamashita *et al.*, 1992a). Además, el MPF no sólo actúa como inductor de la maduración meiótica sino también como regulador universal de la transición G2/M del ciclo celular de eucariotas (Maller, 1995).

El comportamiento de los componentes del MPF, Cdc2 y ciclina B durante la maduración del oocito se ha estudiado extensamente en ciprínidos (Hirai *et al.*, 1992; Katsu *et al.*, 1993). En estos trabajos se ha visto que la Cdc2 está presente en oocitos inmaduros, mientras que la ciclina B es sintetizada de novo durante el proceso de maduración a partir de su ARNm mensajero almacenado en el oocito (Fig. 4). La ausencia de ciclina B en oocitos inmaduros se ha demostrado también en el pez gato (*Heteropneustes fossilis*), la lamprea (*Petromyzon marinus*) y el pez cebra (*Danio rerio*) (Tanaka *et al.*, 1995; Kondo *et al.*, 1997). En la carpa se ha observado que la inyección de ciclina B en oocitos



inmaduros induce la rotura de la vesícula germinal (Katsu *et al.*, 1993). De este modo, la síntesis de ciclina B es posiblemente un proceso clave para el inicio de la maduración del oocito de teleósteos. La ciclina B se une después a la subunidad Cdc2 ya existente en el oocito para formar el MPF, y este es después activado mediante fosforilación de la subunidad Cdc2.

El ARNm de ciclina B en oocitos inmaduros se encuentra uniformemente distribuido en el citoplasma (Kondo *et al.*, 2001). A medida que los oocitos crecen, el ARNm de ciclina B se mueve hacia el futuro polo animal, y al final del periodo de crecimiento, el ARNm se localiza en el córtex animal del oocito. El ARNm se dispersa otra vez por el citoplasma en respuesta a la estimulación por el MIS. Se piensa que este cambio conformacional inducido por el MIS permite la poliadenilación del ARNm, activando de este modo su traslación y la síntesis de ciclina B (Katsu *et al.*, 1999). En oocitos inmaduros una proteína celular de la familia «DEAD box» («Y box protein»), que se une al ARNm de ciclina B, podría estar implicada en la represión de la síntesis de ciclina B (Katsu *et al.*, 1997). No obstante, los mecanismos moleculares responsables del enmascaramiento y desenmascaramiento del ARNm de ciclina B son todavía muy desconocidos.

La activación del MPF se regula mediante modificaciones bioquímicas (fosforilación y defosforilación) de la subunidad Cdc2 en oocitos maduros (Fig. 4). La fosforilación de la treonina 161 de la Cdc2 causa la activación del MPF. La proteína quinasa activadora de Cdk (CAK), que contiene Cdk7 como subunidad catalítica y que está presente en el oocito durante todo el periodo de crecimiento, es la responsable de esta fosforilación, aunque no actúa sobre Cdc2 monomérica sino específicamente sobre Cdc2 unida a ciclina B (Kondo *et al.*, 1997). Por tanto, en cuanto el MIS induce la formación del MPF este es rápidamente fosforilado y activado. En la perca de agua dulce (*Anabas testudineus*), la fosfatasa Cdc25 se ha implicado en la activación del MPF a través de un mecanismo distinto (Basu *et al.*, 2004). En esta especie, al igual que ocurre en algunos anfibios, se piensa que el complejo Cdc2-ciclina B está ya formado y fosforilado en la treonina 161 y la treonina 14/tirosina 15 de la Cdc2 en oocitos inmaduros. En este modelo el MIS estimularía la actividad de la Cdc25, la cual desfosforilaría



la treonina 14/tirosina 15 de la Cdc2 produciéndose de este modo MPF activo.

La proteína Cdc2 puede unirse también a la ciclina A, que a diferencia de la ciclina B, se encuentra en el oocito durante los periodos de crecimiento y maduración. El complejo Cdc2-ciclina A se forma en oocitos maduros y la actividad quinasa del complejo aumenta drásticamente durante la maduración, justo después de la finalización de la primera división meiótica (Katsu *et al.*, 1995). Estas observaciones sugieren que la ciclina A podría intervenir en los mecanismos posteriores a la rotura de la vesícula germinal. En peces ginogenéticos esta ciclina podría estar también implicada en la inhibición de la primera división meiótica (Xie *et al.*, 2003).

6.2.6. Funciones del MPF

Aunque la naturaleza bioquímica del MPF es bien conocida se sabe muy poco sobre su mecanismo de acción. De hecho, hasta la fecha, sólo unas pocas proteínas han sido identificadas como sustratos del MPF. Una de estas proteínas es la lamina B3, filamento intermediario que forma parte de la envoltura del núcleo del oocito. La descomposición de la lamina de la vesícula germinal, indispensable para que se pueda romper, podría estar inducida por la fosforilación de las moléculas de lamina B3 por Cdc2 (Yamaguchi *et al.*, 2001).

La migración del núcleo del oocito y la formación de los usos meióticos durante la maduración requiere cambios importantes en la organización de los componentes del citoesqueleto. En anfibios, dos proteínas quinasas, el MPF y la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), juegan un papel central en estos cambios morfológicos (Kotani y Yamashita, 2002). Aunque en teleósteos no está demostrado el papel de estas proteínas en la organización del citoesqueleto del oocito, en la carpa dorada se han descrito importantes modificaciones de microtúbulos durante la migración de la vesícula germinal hacia el polo animal del oocito (Jiang *et al.*, 1996).

El factor de elongación 1 γ (EF-1 γ) eucariótico, que es responsable de la elongación de la cadena polipeptídica durante la síntesis de proteínas en el ribosoma, ha sido identificado como uno de los sustratos principales del MPF (Belle *et al.*, 1995). En la carpa, esta posibilidad ha



sido investigada y los análisis han demostrado que el EF-1 γ es efectivamente fosforilado por el MPF, lo que sugiere que la fosforilación de este factor posiblemente juega un papel en la síntesis de proteínas durante la maduración del oocito (Tokumoto *et al.*, 2002).

6.2.7. Competencia del oocito para la maduración

Cuando los oocitos finalizan la etapa de crecimiento todavía no son competentes para madurar en respuesta a la LH hasta que adquieren la capacidad de producir y responder al MIS. Los mecanismos implicados en este proceso no son todos bien conocidos, aunque parece que este está regulado por la LH. Esta hormona está implicada en el cambio en las vías esteroideogénicas en las células foliculares para la síntesis del MIS (ver arriba), así como en la síntesis de novo de su receptor en el oocito y el transporte a la membrana plasmática (Patiño *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2001). Por tanto, en muchas especies de peces los oocitos postvitelogénicos extraídos del ovario son «incompetentes» para madurar *in vitro* cuando se estimulan con progestágenos, a menos que se preincuben previamente con LH o con hormona coriónica humana (hCG).

Los oocitos en previtelogénesis y vitelogénesis tampoco pueden madurar en respuesta al MIS debido a un mecanismo adicional. Kondo *et al.* (1997) han demostrado que los oocitos en crecimiento contienen concentraciones de proteínas de Cdc2 y Cdk7, así como de ARNm de ciclina B, similares a las observadas en oocitos justo antes de la maduración. De acuerdo con ello, la inyección de ciclina B recombinante o de ARNm de ciclina B sintetizado *in vitro* (poliadenilado) causa la activación de Cdc2 en oocitos en crecimiento. Estas observaciones sugieren que la incapacidad de los oocitos vitelogénicos para madurar en respuesta al MIS no es causada por la ausencia de los componentes del MPF (Cd2 y Cdk7) sino por la ausencia de los componentes que llevan a la activación del ARNm de ciclina B, incluyendo aquellos implicados en la recepción del MIS y la consiguiente señalización intracelular (Kondo *et al.*, 2001).

6.2.8. Mecanismos moleculares para el mantenimiento de la fertilizabilidad de los huevos

Como ya se ha indicado, durante la maduración de los oocitos la meiosis queda detenida en la metafase II (i.e., arresto en metafase II).



Este mecanismo es esencial para mantener la capacidad de los huevos para ser fertilizados después de la ovulación.

6.2.8.1. Parada meiótica de los huevos en metafase II

La parada en metafase II es un hecho observado en huevos no fertilizados de muchos vertebrados, incluidos los teleósteos, el cual es causado por un complejo citoplasmático llamado factor citostático (CSF) (Schmidt *et al.*, 2006). El componente clave de este complejo es Mos, el producto del proto-oncogen *c-mos*, que estabiliza la actividad del MPF (Sagata, 1996). Este mecanismo se basa en la inhibición de la destrucción de ciclina B por Mos a través de una vía que incluye la MAPK. La progresión de la meiosis desde metafase hasta anafase se inicia con una elevación transitoria de los niveles intracelulares de Ca^{2+} en el huevo que ocurre durante la fertilización (Tunquist y Maller, 2003; Schmidt *et al.*, 2006).

Los huevos detenidos en metafase II poseen una elevada actividad quinasa de Cdc2. Cuando estos son fertilizados, o activados artificialmente, la actividad de la Cdc2 disminuye dramáticamente coincidiendo con la destrucción de la ciclina B (Iwamatsu *et al.*, 1999). La destrucción de la ciclina B ocurre mediante un proceso de proteólisis mediado por ubiquitina (Tunquist y Maller, 2003; Schmidt *et al.*, 2006). En la carpa este proceso sucede en dos fases. En la primera, el 26S proteasoma digiere parcialmente la ciclina B en la posición lisina 57, y durante la segunda, la ciclina B truncada es modificada por ubiquitina para ser completamente digerida por el 26S proteasoma, lo que lleva a la completa inactivación del MPF (Tokumoto *et al.*, 1997b).

6.2.8.2. Funciones de Mos y MAPK durante la parada en metafase II

En anfibios, la actividad quinasa de Mos y MAPK, esta última activada por Mos, es necesaria y suficiente para mantener la parada meiótica en metafase II (Tunquist y Maller, 2003). En la carpa, Mos está ausente en oocitos inmaduros justo antes de la rotura de la vesícula germinal, mientras que su concentración aumenta hasta niveles máximos en oocitos maduros (Kajiura-Kobayashi *et al.*, 2000). Después de la fertilización, Mos desaparece. La actividad de la MAPK sigue la misma



dinámica de Mos, aumenta durante la maduración y alcanza su máximo nivel en oocitos maduros. La inyección de ARNm de Mos de carpa dorada o de *X. laevis* en embriones de 2 células de carpa o de *X. laevis* inhibe la división celular y detiene el ciclo celular en metafase, lo que indica que Mos es esencial para mantener la parada en metafase II en los huevos no fertilizados.

6.3. CONTROL PARACRINO DE LA MADURACIÓN DEL OOCITO

La estrecha comunicación bidireccional entre el oocito y las células somáticas en el folículo ovárico, basada en la liberación local de compuestos químicos, es esencial para modular las señales activadas por la FSH y la LH. En mamíferos las moléculas mejor caracterizadas que intervienen en estos procesos son factores de crecimiento y diferenciación, como el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I) y 2 (IGF-II), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y miembros de la superfamilia de factores de transformación del crecimiento β (TGF β), como activina, inhibina, follistatina y factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9) (Hillier, 2001). No obstante, neuropéptidos, como el factor de liberación de GTHs (GnRH), y neurotransmisores, como serotonina (5-HT) o acetilcolina, también pueden intervenir de forma local para regular la función ovárica (Aguado, 2002; Ramakrishnappa *et al.*, 2005).

6.3.1. GnRH

Un gran número de estudios indican la presencia de GnRH y de sus receptores en las gónadas de teleósteos, lo cual apoya la hipótesis de que la producción local de este péptido juega un papel autocrino/paracrino en la regulación de la función del ovario. Además, se ha demostrado la presencia de compuestos con actividad parecida a GnRH en extractos ováricos que se unen de forma específica a los receptores de GnRH de ovario y pituitaria. (Habibi *et al.*, 2001). En la carpa dorada, el análisis de extractos ováricos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) indica la presencia de dos fracciones con elevada actividad GnRH; una de



ellas corresponde a una de las formas de GnRH (GnRH tipo salmón; sGnRH), mientras que la otra no ha podido ser identificada. Esta fracción puede corresponder a una forma nueva de GnRH_a, o a una variante de GnRH producida como resultado del empalme alternativo («splicing») de las moléculas de ARNm de GnRH. En el pez gato africano (*Clarias gariepinus*) y la dorada (*Sparus aurata*) también se ha demostrado la existencia de compuestos con actividad GnRH en el ovario.

En la carpa dorada se ha observado que el GnRH influencia la esteroideogénesis, la maduración del oocito, la actividad del MPF y la muerte celular (apoptosis) (Andreu-Vieyra *et al.*, 2005). En esta especie, las dos formas de GnRH que se encuentran en el ovario estimulan la maduración del oocito *in vitro*. No obstante, la sGnRH muestra un efecto inhibitorio sobre la esteroideogénesis y maduración ovocitaria inducida por GTH, mientras que la otra forma no tiene efecto sobre las respuestas inducidas por GTH. Estas observaciones sugieren que las acciones estimuladoras e inhibitoras de sGnRH sobre los folículos ováricos pueden estar mediadas por distintas vías metabólicas activadas por el receptor (Pati y Habibi, 2002).

La clonación de ADNc (ADN copiado a partir de ARNm) codificante para precursores de GnRH ha hecho posible en los últimos años la investigación de la expresión de los genes de GnRH en el ovario de teleósteos. El estudio de las secuencias de aminoácidos de cada una de las formas de GnRH, y de los genes correspondientes, indica que el GnRH está unido a un péptido («GnRH-associated peptide», GAP) en el cual se observan varias regiones intrónicas. Ello puede explicar la existencia de empalme alternativo que resulta en la síntesis de ARNm de GnRH con diferentes tamaños (Habibi *et al.*, 2001; Uzbekova *et al.*, 2001; Lethimonier, *et al.*, 2004). En la trucha, el análisis de la expresión de ARNm de dos formas de sGnRH (sGnRH-I y sGnRH-II) y cGnRH-II, así como de un receptor de GnRH, indica que estos ARN se acumulan en el folículo ovárico de forma diferente dependiendo del estado de foliculogénesis y la edad del animal (Uzbekova *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2002). Ello puede indicar funciones paracrinas distintas de cada uno de estos ARNs, aunque sus acciones específicas son desconocidas.



6.3.2. Factores de crecimiento

Numerosos estudios indican el posible papel paracrino del sistema de IGF en el ovario de teleósteos. Este sistema puede ser regulado por hormonas sexuales además de por la hormona del crecimiento (Gioacchini *et al.*, 2005), y se encuentra presente en folículos ováricos durante la etapa de maduración (Kagawa *et al.*, 1995; Gutiérrez *et al.*, 1993; Maestro *et al.*, 1997, 1999; Bobe *et al.*, 2003, 2004). El posible papel de los IGF en el ovario se ha inferido a partir de estudios *in vitro*, los cuales sugieren que las acciones pueden ser diferentes según las especies. Así, los IGF pueden inducir la competencia del oocito y la activación de la meiosis por medio de la estimulación de la producción del MIS por las células foliculares, o actuando directamente sobre el oocito (Kagawa *et al.*, 1994; Maestro *et al.*, 1995; Negatu *et al.*, 1998; Weber y Sullivan, 2000, 2001, 2005). En algunos casos, los IGF inducen exclusivamente la competencia del oocito para la maduración (Weber y Sullivan, 2005).

El mecanismo de regulación ovárica por activina, así como los componentes de señalización intracelular implicados, ha sido recientemente caracterizado en el pez cebra (Fig. 5). En esta especie, tres líneas de evidencia apoyan el papel del sistema activina para modular la estimulación por GTH: *i*) la subunidad B de activina recombinante amplifica la señal de LH y MIS para inducir la maduración del oocito, y es capaz por sí misma de estimular la maduración; *ii*) la folistatina, que une activina con una elevada afinidad, bloquea tanto la maduración inducida por activina como por LH; y *iii*) la vía AMPc-PKA activada durante la estimulación por LH induce la síntesis de activina y folistatina (Ge, 2005). De este modo, se piensa que la activina producida por las células foliculares afecta al oocito de forma paracrina, ya que este expresa receptores para activina y componentes intracelulares para la transducción de la señal (e.g., Smad2, 3, 4 y 7). Por el contrario, la folistatina, que se expresa principalmente en el oocito, modularía el efecto de la activina en el folículo.

En el pez cebra el sistema de EGF también se activa durante la estimulación del folículo ovárico por GTH y es dependiente de la vía de AMPc y PKA. Este sistema podría servir para controlar la síntesis de

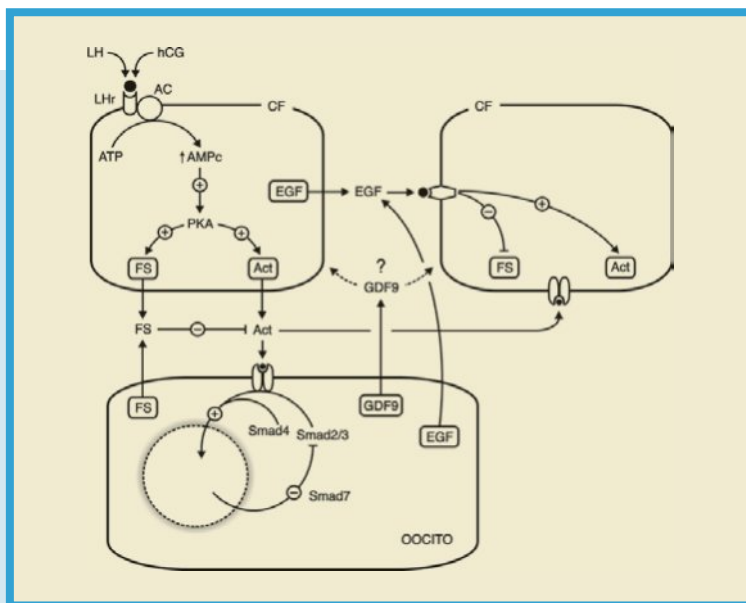


FIGURA 5.

Modelo hipotético de la comunicación paracrina intrafolicular en el folículo ovárico del pez cebra. CF, células foliculares; LHr, receptor de LH; FS, folistatina; Act, activina; PKA, proteína quinasa A; EGF, factor de crecimiento epidérmico; GDF9, factor de crecimiento y diferenciación 9 (modificado de Ge, 2005).

activinas en las células foliculares, que son las únicas que expresan el receptor de EGF (Ge, 2005). Así, se ha hipotetizado la existencia de un mecanismo de regulación intrafolicular entre el oocito y las células foliculares mediado por activina y EGF, el cual controlaría el crecimiento y maduración del oocito.

En mamíferos es conocido que el GDF9, que es producido específicamente por el oocito, controla la foliculogénesis mediante la regulación de la actividad transcripcional de las células foliculares, y de este modo influencia la diferenciación y proliferación de estas células (Matzuk *et al.*, 2002). En el pez cebra, recientes estudios indican la existencia de un ARNm similar al GDF9 de mamíferos que se expresa principalmente, y de forma elevada, en el oocito durante los estadios iniciales de crecimiento del folículo (Ge, 2005). Este perfil de expresión del GDF9



es inverso al de los receptores de FSH y LH, lo que podría sugerir que las GTHs controlan la expresión de GDF9. El hecho de que la hCG, que activa los receptores de LH en el pez cebra, suprime la expresión de GDF9 in vitro puede apoyar esta hipótesis (Ge, 2005). Aunque todavía es necesario investigar con más detalle la función del GDF9 en teleósteos, el característico modelo de expresión espacio-temporal del ARNm de GDF9 en los folículos ováricos del pez cebra, junto con la elevada expresión de EGF y folistatina en el oocito, sugieren que el oocito de teleósteos puede ser un centro de señalización para controlar la folículo-logénesis como se ha sugerido en mamíferos (Ge, 2005).

6.3.3. Neurotransmisores

La función de los neurotransmisores en el control de la reproducción de vertebrados a través de la regulación de la liberación de GTH es bien conocida. Sin embargo, un gran número de evidencias en mamíferos apuntan a que ciertas aminas biógenas, como la 5-HT, pueden influenciar las gónadas directamente, bien afectando la síntesis de esteroides por las células foliculares o bien actuando directamente sobre el oocito (Buznikov *et al.*, 1996; Sirotkin y Schaeffer, 1997). En teleósteos, experimentos in vitro sugieren que la 5-HT podría estar implicada en el control de la maduración del oocito in vivo (Iwamatsu *et al.*, 1992a, 1993; Cerdà *et al.*, 1995, 1997, 1998ab). El efecto de la 5-HT, sin embargo, parece ser completamente opuesto dependiendo de la especie estudiada. Así, mientras que en el medaka (*Oryzias latipes*) la 5-HT estimula la síntesis in vitro de 17β -estradiol y MIS por las células de la granulosa, activando de este modo la maduración del oocito (Iwamatsu *et al.*, 1992a, 1993), en el fúndulo (*Fundulus heteroclitus*) la 5-HT inhibe de forma reversible la maduración in vitro inducida tanto por hCG como por el MIS (Cerdà *et al.*, 1995). En esta última especie, el efecto inhibitorio de la 5-HT parece estar mediado por un receptor específico de 5-HT en el oocito, el cual se encuentra farmacológicamente relacionado con los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT₂ y 5-HT₃ de mamíferos, así como con receptores de 5-HT de algunos moluscos bivalvos (Cerdà *et al.*, 1997). Este receptor parece que está unido a la adenil ciclasa ya que la 5-HT aumenta los niveles de AMPc en el oocito estimulando de este modo la vía de transducción de señal de la PKA (Cerdà *et al.*,



1998a). Ello puede indicar que el putativo receptor de 5-HT del oocito de fúndulo está conectado con proteínas G. In vivo, el efecto inhibitorio de la maduración del oocito por 5-HT no se encuentra regulado por hCG o estradiol, sino que podría estar controlado por cambios fisiológicos en la sensibilidad del oocito para madurar en respuesta al MIS (Cerdà *et al.*, 1998b). De este modo, el modelo de acción de la 5-HT en el fúndulo es similar al descrito en anfibios, donde la 5-HT inhibe la maduración del oocito inducida por progesterona aparentemente a través de receptores situados en la membrana plasmática de las células de la granulosa y del oocito, así como en el citoplasma de este último (Nikitina *et al.*, 1988, 1993).

6.4. LA HIDRATACIÓN DEL OOCITO

A diferencia de otros vertebrados, el 67-75 % del volumen final del huevo de teleósteos se alcanza durante la maduración del oocito (Fig. 6). El aumento de volumen que experimenta el oocito durante la madura-

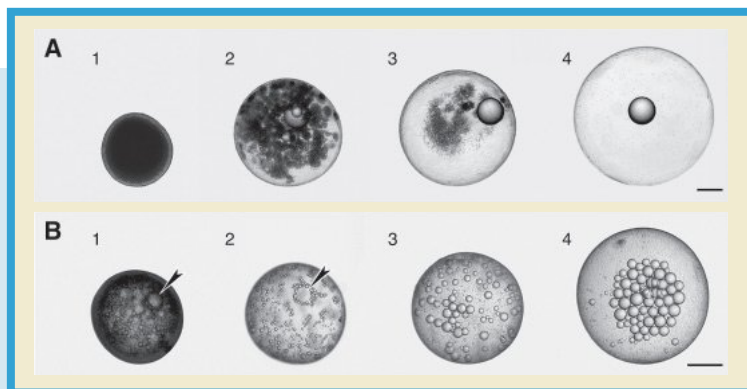


FIGURA 6.

Secuencia de fotografías de folículos ováricos (oocitos rodeados de las células foliculares) de teleósteos durante la maduración. A) Folículos de una especie pelagófila, la dorada (*Sparus aurata*). Barra 200 μm . B) Folículos de una especie bentófila, el fúndulo (*Fundulus heteroclitus*). Barra 500 μm . En ambos casos: 1, oocitos postvitelogénicos justo antes de la maduración; 2-3, oocitos en maduración; y 4, oocitos maduros antes de la ovulación.



ción puede variar desde un ligero incremento en especies de agua dulce y eurihalinas hasta un aumento de varias veces de magnitud en especies marinas (Cuadro 1). La captación masiva de agua por el oocito (hidratación) es la principal causa de este fenómeno. De este modo, el contenido en agua de los oocitos maduros puede contribuir hasta el 90-95 % de su peso, lo que proporciona a los huevos una flotabilidad positiva en el agua de mar. Las especies que producen huevos poco hidratados con una flotabilidad nula o muy reducida (demersales) se denominan bentófilas (especies de agua dulce y algunas especies marinas), mientras que las especies que producen huevos muy hidratados y flotantes (huevos pelágicos) se clasifican como pelagófilas (prácticamente sólo especies marinas).

En especies pelagófilas la flotabilidad de los huevos en el mar facilita su dispersión y un aporte eficiente de oxígeno al embrión, aumentando de este modo su supervivencia (Craik y Harvey, 1987; Mellinger, 1994; Nissling *et al.*, 2003). La hidratación del oocito puede facilitar además la fertilización una vez los huevos son liberados en el agua. Por tanto, la flotabilidad de los huevos recién fertilizados se emplea en los criaderos de peces marinos como el primer marcador de viabilidad del huevo (Kjørsvik *et al.*, 1990). Por el contrario, las implicaciones ecológicas de la hidratación del oocito de teleósteos marinos bentófilos no están tan claras. Greeley *et al.* (1991) han sugerido una posible explicación si se considera el hábitat en el cual algunas de estas especies se reproducen, como por ejemplo el fúndulo. Esta especie presenta un ciclo reproductivo semilunar, y como otros ciprinodóntidos, realiza la puesta de los huevos sobre sustratos vegetales o sobre la arena en zonas intermareales que sólo son inundadas con las mareas altas (Taylor, 1984). De este modo los huevos fertilizados pueden iniciar el desarrollo embrionario en ausencia de agua, aunque en zonas relativamente protegidas, y eclosionar durante la siguiente marea alta. Un ejemplo extremo de esta capacidad de resistencia a la desecación es *Austrofundulus limnaeus*, ciprinodóntido de agua dulce que es capaz de sobrevivir en un estado quiescente durante meses en zonas deshidratadas de la sabana Sudamericana (Podrabsky *et al.*, 2001). Estas estrategias reproductivas sugieren que la hidratación del oocito en especies bentófilas marinas podría servir para suministrar un



CUADRO 1.

Cambios de volumen relativos del oocito (V, mm³) y de contenido de agua (A, % en peso) durante la maduración meiótica en teleósteos bentófilos y pelagófilos

Especie	Inmaduro		Maduro		x	Referencias
	V	A	V	A		
Bentófilos de agua dulce						
<i>Carassius auratus</i>	0,5	68	0,5	75	1,0	Greeley <i>et al.</i> (1986)
<i>Danio rerio</i>	0,17		0,21		1,2	Selman <i>et al.</i> (1993)
<i>Esox lucius</i>		65		72		Craik y Harvey (1984)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>		52		56		Craik y Harvey (1984)
<i>Oryzias latipes</i>	0,5	76	0,8	81	1,4	Hirose (1976)
<i>Perca fluviatilis</i>		79		85		Craik y Harvey (1986)
<i>Plecoglossus altivelis</i>	0,4	60	0,7	79	1,8	Hirose <i>et al.</i> (1974)
Bentófilos marinos						
<i>Clupea harengus</i>		66		74		Craik y Harvey (1986)
<i>Cyprinodon variegatus</i>	0,3		0,9		2,8	Greeley <i>et al.</i> (1986)
<i>Dormitator maculatus</i>	0,011		0,014		1,3	Greeley <i>et al.</i> (1986)
<i>Fundulus heteroclitus</i>	1,3	61	2,9	81	2,2	Greeley <i>et al.</i> (1991)
<i>Fundulus majalis</i>	2,57		8,18		3,0	Greeley <i>et al.</i> (1986)
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	0,7	74	1,4	80	2,1	Wallace y Selman, (1979)
<i>Gobionellus boleosoma</i>	0,01		0,02		2,4	Greeley <i>et al.</i> (1986)
<i>Labrus bergylta</i>	0,16	71	0,36	76	2,7	Finn <i>et al.</i> (2002b)
<i>Limanda yokohamae</i>	0,1	69	0,2	82	1,7	Oshiro y Hibiya (1981b)
<i>Pomatoschistus minutus</i>		70		68		Craik y Harvey (1986)
<i>Spinachia spinachia</i>		75		77		Craik y Harvey (1986)
Pelagófilos marinos						
<i>Aspitrigla cuculus</i>	0,52		1,95		3,8	Fulton (1898)
<i>Callionymus lyra</i>	0,18	76	0,52	90	2,9	Craik y Harvey (1986)
<i>Centropristis striata</i>	0,1	54	0,4	93	3,7	Selman <i>et al.</i> (2001)
<i>Ctenolabrus rupestris</i>	0,05	62	0,34	93	8,4	Finn <i>et al.</i> (2002b)
<i>Cynoscion nebulosus</i>	0,02	67	0,1	76	4,6	LaFleur y Thomas (1991)
<i>Eutrigla gurnardus</i>	0,38		1,60		4,2	Fulton (1898)
<i>Gadus morhua</i>	0,4	71	1,6	92	4,0	Craik y Harvey (1987)
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	3,4	63	14,1	90	4,1	Finn <i>et al.</i> (2002a)
<i>Micropogonias undulatus</i>	0,1	73	0,2	83	3,8	LaFleur y Thomas (1991)
<i>Microstomus kitt</i>	0,2		1,0		6,3	Thorsen y Fyhn (1996)
<i>Molva molva</i>	0,18	64	0,66	89	3,7	Craik y Harvey (1987)
<i>Mugil cephalus</i>	0,2	60	0,5	85	2,9	Watanabe y Kuo (1986)
<i>Pleuronectes platessa</i>	0,9	68	3,3	93	3,7	Craik y Harvey (1987)
<i>Scomber scombrus</i>	0,32		1,02		3,2	Fulton (1898)
<i>Scophthalmus maxima</i>	0,18		0,56		3,1	Fulton (1898)
<i>Scophthalmus rombus</i>	0,27		1,15		4,2	Fulton (1898)
<i>Solea vulgaris</i>	0,38		1,44		3,8	Fulton (1898)
<i>Sparus aurata</i>	0,1	63	0,5	92	4,5	Fabra <i>et al.</i> (2006)
<i>Takifugu rubripes</i>	0,29		1,02		3,5	Chuda <i>et al.</i> (1998)
<i>Tautogolabrus adspersus</i>	0,1		0,3		4,9	Wallace y Selman (1981)
<i>Trachinus vipera</i>	0,27		1,20		4,4	Fulton (1898)
<i>Verasper moseri</i>	0,7	69	2,8	91	4,1	Matsubara y Koya (1997)

En la columna de derecha se indica el aumento de volumen relativo (x). En *P. altivelis* el cambio de volumen del oocito ocurre principalmente durante la ovulación y oviposición, más que durante la maduración.



reservorio de agua al embrión y de este modo asegurar el desarrollo en ambientes deshidratados.

6.4.1. Los Aminoácidos libres como efectores osmóticos

Hace aproximadamente 20 años, Wallace y colaboradores describieron por primera vez en el fúndulo el proceso de hidrólisis de las proteínas del vitelo del oocito que ocurre específicamente durante la maduración e hidratación (Wallace y Selman, 1985; Wallace y Begovac, 1985). Este mecanismo de hidrólisis, único en vertebrados ovíparos, se ha observado después en muchas otras especies de teleósteos (Greeley *et al.*, 1986; Carnevali *et al.*, 1992, 1993; Okumura *et al.*, 1995; Matsubara *et al.*, 1995, 1999; Matsubara y Sawano, 1995; Thorsen y Fyhn, 1996; Cerdà *et al.*, 1996; Matsubara y Koya, 1997; Reith *et al.*, 2001; Selman *et al.*, 2001; Finn *et al.*, 2002ab; Fabra *et al.*, 2006; Sawaguchi *et al.*, 2006), y se ha demostrado que es el origen de los aminoácidos libres («free amino acids», FAA) en el oocito. Todos estos estudios indican que el grado de hidrólisis del vitelo está correlacionado con el grado de hidratación del oocito, siendo esta más pronunciada en especies pelagófilas que en bentófilas (Fig. 7).

Muchos organismos, incluyendo los peces, emplean FAA para la regulación del volumen celular, y por ello se considera que los FAA derivados de la hidrólisis del vitelo podrían funcionar como efectores osmóticos durante la hidratación del oocito (Oshiro y Hibiya, 1981ab; Wallace y Begovac, 1985; Wallace y Selman, 1985; Greeley *et al.*, 1986; Watanabe y Kuo, 1986; Craik y Harvey, 1987) (Cuadro 2). Esta hipótesis está apoyada por estudios en los que se ha determinado el contenido de FAA de huevos pelagófilos y bentófilos, tanto *in vivo* como *in vitro*, demostrando un aumento en la producción endógena de FAA durante la maduración del oocito (Thorsen y Fyhn, 1996).

Thorsen *et al.* (1996) observaron que existe un perfil similar de abundancia de aminoácidos entre el pool de FAA de los huevos y algunas proteínas del vitelo del oocito, lo que indica que los FAA se originan muy probablemente a partir de estas proteínas. En algunas especies se ha demostrado que los procesos de hidrólisis y acumulación de FAA tienen una correlación positiva con el contenido de agua de los huevos (Matsubara y Koya, 1997; Reith *et al.*, 2001; Selman *et al.*, 2001; Finn

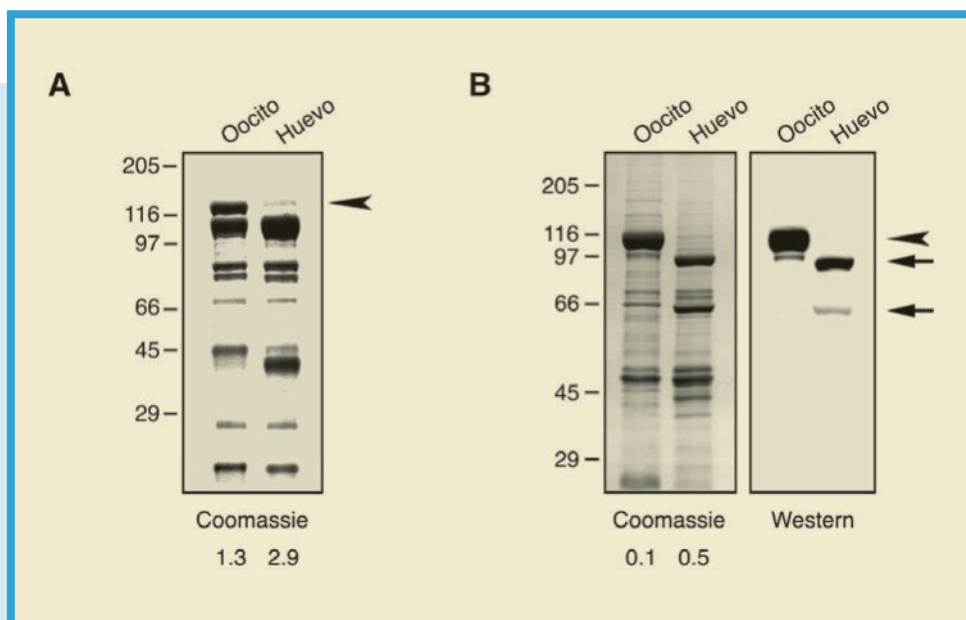


FIGURA 7.

Perfil electroforético de las proteínas del vitelo en oocitos y huevos de fúndulo (A) y dorada (B). Las proteínas del vitelo han sido coloreadas con el colorante azul coomassie y detectadas mediante Western blot utilizando un antisuero contra vitelogenina. Las puntas de flecha indican lipovitelininas de aproximadamente 122 y 103 kDa en el fúndulo y la dorada, respectivamente. Las flechas indican péptidos más pequeños que posiblemente resultan de la hidrólisis de las lipovitelininas. Los valores de masa molecular están indicados a la izquierda en kDa, y los volúmenes de oocitos y huevos (en mm³) para cada especie aparecen debajo de cada panel.

et al., 2002ab), lo que confirma el papel de los FAA como efectores osmóticos durante la hidratación del oocito. Además, existen una serie de evidencias directas e indirectas que apoyan esta hipótesis. En primer lugar, se ha observado que algunas especies pelagófilas que viven en zonas del Mar Báltico con salinidad oscilante pueden ajustar la flotabilidad de los huevos mediante el control de la hidrólisis del vitelo y la consiguiente producción de FAAs, regulando de este modo la hidratación y la flotabilidad de los huevos (Thorsen *et al.*, 1996). En segundo lugar, los huevos no flotantes de peces pelagófilos que se producen a menudo cuando se induce la puesta mediante tratamiento hormonal



muestran un contenido de FAA y agua menor que los huevos flotantes (e.g., Seoka *et al.*, 2003). Finalmente, y de un modo más directo, se ha demostrado que la inhibición de la hidrólisis del vitelo durante la maduración in vitro del oocito bloquea la producción de FAA y reduce la hidratación (Selman *et al.*, 2001; Fabra *et al.*, 2006). No obstante, hay que señalar que generalmente sólo la mitad de la osmolalidad de los huevos pelágicos puede ser atribuida a los FAA (Finn *et al.*, 2002a), lo que indica la presencia de otros compuestos de bajo peso molecular que pueden ser osmóticamente activos (ver más adelante).

En comparación con especies pelagófilas muy pocos estudios han investigado el contenido en FAA de los oocitos de teleósteos bentófilos (Cuadro 2). Algunos de estos trabajos indican cambios muy débiles en el perfil electroforético de las proteínas del vitelo o en el pool de FAA

CUADRO 2.

Cantidad total y concentración de FAAs en oocitos inmaduros y huevos de peces bentófilos y pelagófilos

Especie	FAAs				Referencia
	nmol/ind		mM		
	Oocitos	Huevos	Oocitos	Huevos	
Bentófilos de agua dulce					
<i>Plecoglossus altivelis</i>	22	72	14	19	Chen <i>et al.</i> (2003)
Bentófilos marinos					
<i>Crenilabrus melops</i>	7	27	54	96	Finn <i>et al.</i> (2002b)
<i>Fundulus heteroclitus</i>	48	141	40	34	Greeley <i>et al.</i> (1991)
<i>Labrus bergylta</i>	6	9	27	41	Thorsen <i>et al.</i> (1993)
<i>Labrus mixtus</i>	5	6	40	27	Finn <i>et al.</i> (2002b)
Pelagófilos marinos					
<i>Centropristis striata</i>	5	48	208	118	Selman <i>et al.</i> (2001)
<i>Ctenolabrus rupestris</i>	5	40	96	119	Finn <i>et al.</i> (2002b)
<i>Gadus morhua</i>	17	223	49	143	Thorsen <i>et al.</i> (1993)
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	280	2.564	82	182	Finn <i>et al.</i> (2002a)
<i>Microstomus kitt</i>	18	165	60	154	Thorsen <i>et al.</i> (1993)
<i>Pleuronectes platessa</i>	36	649	33	175	Thorsen <i>et al.</i> (1993)
<i>Verasper moseri</i>	3	46		149	Matsubara y Koya (1997)

Las concentraciones están calculadas a partir del volumen del oocito y del huevo. Para *P. altivelis* los datos de contenido en FAAs están expresados en nmol/mg peso seco. Para *V. moseri* estos están expresados en µg/ind.



de los oocitos durante la maduración (Greeley *et al.* 1991; Finn *et al.*, 2002b). Estas observaciones son consistentes con la nula o muy baja hidratación que ocurre en estos oocitos durante la maduración. Sin embargo, en algunas especies bentófilas, como el fúndulo y la porredana (*Crenilabrus melops*), se detecta una cierta hidrólisis de las proteínas del vitelo asociada a un aumento de 2.9-3.8 órdenes de magnitud en el contenido de FAA del oocito (Wallace y Begovac, 1985; Greeley *et al.* 1986, 1991; Finn *et al.*, 2002b) (Fig. 7B). En estas especies, la taurina es con mucho el aminoácido más abundante en el pool de FAA (Greeley *et al.*, 1991; Thorsen y Fyhn, 1996; Finn *et al.*, 2002b), a diferencia de los oocitos de las especies pelagófilas donde este aminoácido sólo contribuye con el 2-4 % del total de FAA (Thorsen y Fyhn, 1996). La taurina es el aminoácido que más se ha relacionado con cambios de volumen celular, y debido a que no contribuye en la formación de proteínas, sus concentraciones intracelulares pueden variar sin afectar el funcionamiento celular. En teleósteos, este aminoácido se ha relacionado con la regulación del volumen de varios tipos celulares (Fugelli y Thoroed, 1990), y debido a que es el FAA más abundante en los oocitos bentófilos, posiblemente tenga la misma función durante el desarrollo folicular normal en peces bentófilos (i.e., regulación frente a condiciones osmóticas). No obstante, al menos en el fúndulo, es muy improbable que la taurina contribuya de forma importante en la hidratación del oocito (Greeley *et al.*, 1991). En esta especie, aunque la cantidad total de taurina aumenta durante la maduración, el flujo de agua al interior del oocito es mucho más elevado, resultando en una disminución de su concentración durante la maduración. Además, el aumento de taurina cesa en el momento de la rotura de la vesícula germinal, mientras que la hidratación continúa aumentando después de este instante (Greeley *et al.*, 1991). No obstante, hay que señalar que comparaciones directas entre el contenido de taurina y el grado de hidratación de oocitos en diferentes estados de maduración no se ha llevado a cabo en otros teleósteos bentófilos además del fúndulo, y por tanto el papel de la taurina en la hidratación del oocito de estas especies es incierto.

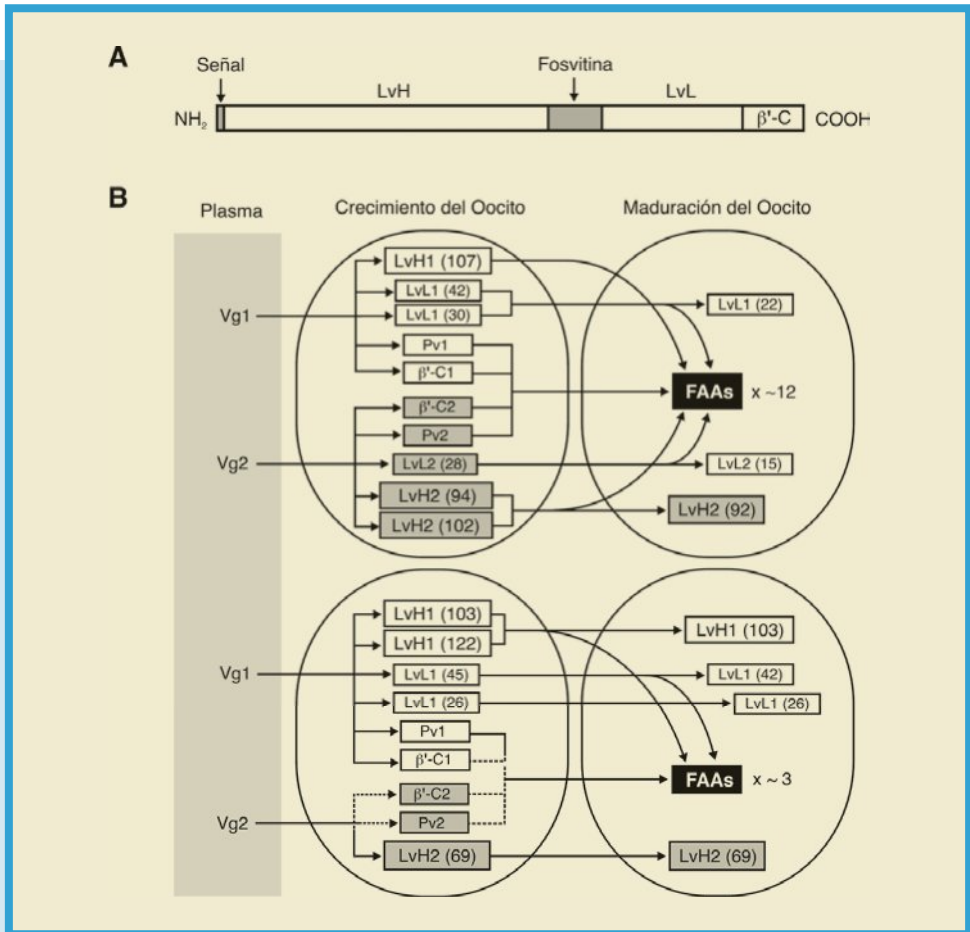
El pequeño pero significativo aumento del pool de FAA en oocitos bentófilos podría jugar sin embargo un papel como efector osmóti-



co durante la hidratación. De hecho, el contenido total en FAA de los oocitos aumenta progresivamente durante la maduración, lo que sugiere que estos compuestos podrían estar implicados en la captación de agua (Greeley *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2003). Esta hipótesis, sin embargo, parece improbable ya que las concentraciones de FAA (excepto taurina) en relación al contenido en agua del oocito se mantienen constantes durante la maduración (Greeley *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 2003), y además, estas concentraciones son relativamente bajas en comparación con las de algunos iones inorgánicos (por ejemplo, menos de la mitad que las concentraciones de Na^+ y K^+ ; Greeley *et al.*, 1991). Por tanto, la contribución de FAA en la hidratación del oocito de especies bentófilas, al menos en el fúndulo, parece mínima. No obstante, como se discutirá más adelante, la hidrólisis de las proteínas del vitelo en el oocito del fúndulo podría facilitar la acumulación de iones K^+ en el oocito.

6.4.2. Procesamiento de las proteínas del vitelo

En teleósteos, al igual que en otros vertebrados ovíparos, la Vg y otras lipoproteínas de baja densidad se producen en el hígado bajo regulación estrogénica. Estas sustancias son secretadas a la circulación sanguínea e incorporadas por el oocito mediante un proceso de endocitosis mediada por receptor (Wallace, 1985; Tyler y Sumpter, 1996; Schneider, 1996). La secuencia de aminoácidos de las Vg puede dividirse en una serie de dominios localizados de forma lineal en la secuencia: NH_2 -cadena pesada de lipovitelina (LvH)-fosvitina (dominio poliserina)-cadena ligera de lipovitelina (LvL)-componente β' (β' -C)- COOH (Fig. 8A). La región aminoacídica cercana al C terminal de la Vg, el β' -C, recibió este nombre a partir de los primeros estudios cromatográficos que se realizaron en teleósteos (Jared y Wallace, 1968). Cada uno de los dominios de las Vg corresponde a las diferentes proteínas del vitelo, lipovitelinas (lipoproteínas), fosvitinas y fosvetas (proteínas muy fosforiladas) y el β' -C, las cuales son almacenadas en el oocito durante la vitelogénesis. Recientes estudios indican que en teleósteos y otros vertebrados existen al menos tres Vg distintas, una de ellas sin el dominio fosvitina, y todas ellas son incorporadas por el oocito (Lee *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2005; Sawaguchi *et al.*, 2006). Durante la maduración del oocito en teleósteos marinos

**FIGURA 8.**

Procesamiento de la vitelogenina (Vg) 1 y 2, y de las proteínas del vitelo derivadas de cada una de ellas, durante el crecimiento y maduración del oocito. **A)** Esquema de la organización de los diferentes dominios en la secuencia de las Vg: cadena pesada de la lipovitelina (LvH), fosvitina (Pv), cadena ligera de la lipovitelina (LvL), y componente β' (β' -C). **B)** Dibujo indicando las alteraciones de la Vg1, Vg2 y proteínas del vitelo en teleósteos pelagófilos (arriba) y bentófilos (abajo). Las líneas de puntos indican vías hipotéticas. La hidrólisis de las proteínas del vitelo resulta en un aumento de los aminoácidos libres (FAA) en el interior del oocito de aproximadamente 12 y 3 veces de magnitud en especies pelagófilas y bentófilas, respectivamente. Las masas moleculares aparentes determinadas por electroforesis se indican en paréntesis. Modificado de LaFleur *et al.* (2005).



las proteínas del vitelo son procesadas una vez más, generando FAA y pequeños péptidos.

6.4.2.1. Cambios ultraestructurales del vitelo durante la maduración del oocito

Las proteínas del vitelo derivadas de las Vg son almacenadas en gránulos o glóbulos de vitelo que se localizan en la zona periférica del citoplasma del oocito. En especies pelagófilas estos glóbulos, rodeados de membrana, se mantienen intactos durante el periodo de crecimiento del oocito, y las proteínas en su interior se organizan en estructuras cristalinas que se pueden visualizar al microscopio electrónico (e.g., Selman y Wallace, 1989; Selman *et al.*, 2001). Durante la maduración del oocito los glóbulos de vitelo se fusionan unos con otros centrípetamente, formando eventualmente una gran masa central de vitelo líquido, menos denso a nivel de microscopio electrónico, que desplaza el citoplasma a la zona más periférica del oocito. Durante este proceso las estructuras cristalinas se disgregan, lo que confiere a los oocitos maduros la característica transparencia. Aunque los mecanismos celulares que intervienen en la fusión de los glóbulos de vitelo y la disgregación de las inclusiones cristalinas son desconocidos, se ha sugerido que podrían ser dependientes de K^+ (Selman *et al.*, 2001).

En los oocitos de especies bentófilas, la fusión de los gránulos de vitelo, que son generalmente no cristalinos, puede ocurrir antes de la maduración del oocito. Por ejemplo, puede darse relativamente pronto durante la vitelogénesis después de la formación de los glóbulos, como en especies de espinoso (*Gasterosteus aculeatus* y *Apeltes quadracus*; Wallace y Selman, 1981), o durante el final de la vitelogénesis, como en la carpa dorada (Yamamoto y Yamazaki, 1961), el bolín (*Cyprinodon variegatus*; Wallace, 1985) y el fúndulo (Selman y Wallace, 1986). En esta última especie la fusión del vitelo se acelera, y se completa, durante la maduración del oocito (Selman *et al.*, 1988; Raldúa *et al.*, 2006). En algunas especies bentófilas de agua dulce, como el pez cebra, los glóbulos de vitelo contienen inclusiones cristalinas las cuales también se disgregan durante la maduración (Selman *et al.*, 1993). Sin embargo, en este caso, los glóbulos no se fusionan necesariamente en una única masa de vitelo.



6.4.2.2. Procesamiento del Vitelo en teleósteos pelagófilos y bentófilos

Las proteínas del vitelo se hidrolizan una segunda vez durante la maduración del oocito, pero este proceso es distinto para cada tipo de proteína (Fig. 8B). En especies pelagófilas, como en una especie de pez plano (*Verasper moseri*) y pargo (*Pagrus major*) japonés, se ha demostrado la presencia de dos moléculas de LvH, LvH1 y LvH2, derivadas de la Vg1 y la Vg2 (también denominadas VgA y VgB), respectivamente, en oocitos postvitelogénicos (Matsubara *et al.*, 1999; Sawaguchi *et al.*, 2006). La proteína LvH2 dimérica es disociada en dos monómeros durante la maduración del oocito, mientras que la LvH1 es hidrolizada completamente para producir FAA. Las fosvitinas y β '-C son también ampliamente degradadas durante la maduración, mientras que las LvL1 y LvL2 son sólo hidrolizadas parcialmente. De este modo, la degradación de la LvH1 contribuye sustancialmente al pool de FAA empleado para la hidratación del oocito, mientras que las LvH2 y LvL permanecen almacenadas en el oocito, posiblemente como fuente de nutrientes para el posterior desarrollo embrionario (Ohkubo y Matsubara, 2002). La Vg que carece del dominio fosvitina solamente se hidroliza ligeramente durante la maduración, y por tanto no parece contribuir en la hidratación del oocito o en la generación de nutrientes (Sawaguchi *et al.*, 2006).

En otras especies de teleósteos pelagófilos, como el eglefino (*Merlangius aeglefinus*), también se han encontrado dos formas de LvH derivadas de la Vg1 y Vg2, y al igual que en *V. Moseri*, la LvH1 es completamente degradada durante la maduración, mientras que la LvH2 sufre sólo una pequeña reducción de tamaño (Reith *et al.*, 2001). En esta especie, la composición del pool de FAA de los huevos es muy similar a la composición de aminoácidos de la LvH1, lo que es consistente con la hipótesis de que este componente del vitelo es la fuente principal de FAA. El perfil electroforético de las proteínas del vitelo de oocitos y huevos de otras especies pelagófilas también sugiere la presencia de dos lipovitelininas distintas (Carnevali *et al.*, 1992, 1993; Okumura *et al.*, 1995; Matsubara *et al.*, 1995; Matsubara y Sawano, 1995; Thorsen y Fyhn, 1996; Cerdà *et al.*, 1996; Matsubara y Koya, 1997; Selman *et al.*, 2001; Finn *et al.*, 2002ab; Fabra *et al.*, 2006).



En especies bentófilas, como el fúndulo, donde también se han encontrado dos Vg distintas (LaFleur *et al.*, 1995ab), el modelo de incorporación de Vg y procesamiento de las proteínas derivadas parece ser distinto. En esta especie, los oocitos postvitelogénicos presentan dos LvH1 de elevado peso molecular (de 122 y 103 kDa) derivadas de la Vg1, mientras que la Vg2 parece que apenas se incorpora en el oocito (LaFleur *et al.*, 2005). Durante la maduración, sólo la LvH1 de 122 kDa y las fosvitinas son degradadas (Wallace y Selman, 1985; Wallace y Begovac, 1985; Greeley *et al.*, 1986; LaFleur *et al.*, 2005), mientras que el pool de FAA aumenta sólo ligeramente (Greeley *et al.*, 1991). En otro teleósteo bentófilo, la lubina blanca (*Morone americana*), también se han encontrado dos LvH1 en el ovario (Hiramatsu *et al.*, 2002b). Sin embargo, en el pez cebra, en el cual los oocitos apenas se hidratan durante la maduración (Cuadro 1), y por tanto aparentemente no se requiere un pool de FAA para funciones osmóticas, también se observa una ligera hidrólisis de lipovitelinas (Selman *et al.*, 1993). Por tanto, todos estos datos indican que las Vgs se procesan de modo distinto entre teleósteos pelagófilos y bentófilos. Asimismo, la presencia de LvH1 en oocitos bentófilos, y su digestión completa o parcial durante la maduración, no se correlaciona necesariamente con un aumento de FAA y la hidratación.

En peces pelagófilos, ambas LvH1 y LvH2 cubren la misma región de sus correspondientes precursores (Vg1 y Vg2), lo que indica que estos sufren mecanismos de proteólisis similares durante la vitelogénesis (Reith *et al.*, 2001). Sin embargo, como ya se ha mencionado, durante la maduración e hidratación del oocito la LvH1 se degrada completamente, mientras que la LvH2 sólo se procesa en la parte C terminal. Una situación algo similar ocurre en el fúndulo, donde las dos LvH1 se procesan de forma diferente. Esta hidrólisis diferencial de las LvH podría estar relacionada con diferencias en la secuencia de aminoácidos, estructura secundaria, o diferente compartimentalización en los glóbulos de vitelo, lo que permitiría a las proteasas distinguir entre las dos LvHs. No obstante, los mecanismos intracelulares específicos que permiten el procesamiento diferencial de las LvH en el oocito de peces permanecen todavía desconocidos.



6.4.2.3. Función de la proteólisis del vitelo en teleósteos bentófilos

Como ya se ha mencionado, los oocitos de teleósteos bentófilos, tanto marinos como de agua dulce, muestran diferentes grados de hidrólisis de las lipovitelinas durante la maduración. Ya que estos oocitos no se hidratan, o lo hacen muy poco, se ignora el significado fisiológico de este proceso. No obstante, es posible que en estas especies los FAA sean solamente empleados como sustratos para la producción de energía vía metabolismo aeróbico y para la síntesis de proteínas durante la embriogénesis (Wright y Fyhn, 2001).

En el fúndulo los primeros estudios realizados indican que el K^+ es el principal efector osmótico para la hidratación del oocito (ver más adelante), mientras que la hidrólisis de LvH1 aparentemente no tiene ningún papel relevante en este proceso (McPherson *et al.*, 1989). Sin embargo, esta conclusión inicial no está de acuerdo con los resultados de recientes experimentos *in vitro* con folículos ováricos de esta misma especie. Estos experimentos demuestran que cuando se inhibe la hidrólisis de LvH1 en folículos incubados en medio de cultivo con K^+ se reduce el influjo de este ión al oocito, y consecuentemente disminuye la hidratación (Raldúa *et al.*, 2006). Estas observaciones un tanto sorprendentes podrían ser sin embargo consistentes con la hipótesis de asociación-inducción de Ling sobre el comportamiento de iones en el interior de la célula (Ling, 1990). Esta hipótesis implica que la modificación química de las proteínas del vitelo en el oocito podría cambiar las propiedades de unión a iones de los péptidos resultantes expuestos a un medio acuoso. De acuerdo con esta hipótesis, es posible que la inhibición de la hidrólisis de las proteínas del vitelo pueda reducir la generación de nuevos «sitios» de unión a K^+ , y de este modo, reducir la acumulación de K^+ en el interior del oocito y la consiguiente presión osmótica. Por tanto, es plausible que la acumulación de iones K^+ en el oocito, siguiendo un gradiente electroquímico facilitado por la proteólisis del vitelo, pueda ser el mecanismo para la hidratación del oocito del fúndulo. Aunque este sistema no está todavía demostrado podría sugerir que la proteólisis del vitelo está implicada esencialmente en la hidratación del oocito tanto en especies pelagófilas como bentófilas.



6.4.2.4. Papel de las proteasas en la hidrólisis de las proteínas del vitelo

En teleósteos las cisteína proteasas, especialmente la catepsina L y catepsina B, y aspártico proteasas, como la catepsina D, parecen ser los principales enzimas responsables de la degradación del vitelo durante el desarrollo embrionario (Murakami *et al.*, 1990; Sire *et al.*, 1994; Carnevali *et al.*, 1999b, 2001b; Kestemont *et al.*, 1999; Hiramatsu *et al.*, 2002a; Tingaud-Sequeira y Cerdà, 2007). Sin embargo, las proteasas implicadas en la hidrólisis del vitelo durante la maduración e hidratación del oocito son muy desconocidas. En la dorada, especie pelagófila, Carnevali *et al.* (1999a) han determinado niveles elevados de actividad de catepsina D y B en oocitos al inicio de la vitelogénesis, mientras que la actividad de la catepsina L es más elevada durante los estadios medios de vitelogénesis. La catepsina L aislada del ovario de la dorada es capaz de hidrolizar lipovitelina purificada *in vitro*, y en base a estas observaciones se ha sugerido que esta enzima podría estar implicada en la proteólisis de lipovitelina durante la maduración del oocito (Carnevali *et al.*, 1999a). Esta hipótesis, aunque todavía no demostrada, es consistente con la elevada actividad de catepsina L en huevos fertilizados de dorada (Carnevali *et al.*, 2001a), y con niveles elevados de ARNm de catepsina L en oocitos de trucha en estados avanzados de vitelogénesis (Kwon *et al.*, 2001).

En especies bentófilas, sin embargo, la maquinaria enzimática activada durante la maduración del oocito parece ser distinta a la propuesta para la dorada. Durante la maduración del oocito de fúndulo la actividad enzimática de la catepsina L tanto *in vivo* como *in vitro* disminuye drásticamente (LaFleur *et al.*, 2005), a pesar de que su ARNm aumenta significativamente en el mismo periodo de tiempo (Fabra y Cerdà, 2004). Por el contrario, la actividad de la catepsina B se incrementa transitoriamente durante la maduración, y este aumento coincide con la máxima degradación de la LvH1 de 122 kDa (LaFleur *et al.*, 2005). Estas observaciones sugieren por tanto que la catepsina B, más que la catepsina L, es posiblemente la proteasa principal implicada en la degradación de la LvH1 en los oocitos del fúndulo. Por tanto, las causas de esta aparente diversidad entre especies pelagófilas y bentófilas en



relación a las proteasas implicadas en la degradación de lipovitelina son enigmáticas. Es posible que el distinto procesamiento de LvH1 y LvH2 en estas especies sea un factor implicado.

Durante el crecimiento del oocito los glóbulos de vitelo se mantienen bajo condiciones ligeramente ácidas por la acción de la ATPasa de protones vacuolar (V-ATPasa) (Mallya *et al.*, 1992; Fagotto y Maxfield, 1994a). En el embrión de la mayoría de organismos, una acidificación posterior producida por la V-ATPasa activa la digestión de las proteínas del vitelo. De este modo, en insectos, las principales proteasas ácidas se almacenan en forma de proenzimas latentes en los glóbulos de vitelo, y son susceptibles de ser activadas por el incremento en las condiciones ácidas (Fagotto, 1990; Cho *et al.*, 1999; Yamahama *et al.*, 2003). A medida que transcurre el desarrollo embrionario los glóbulos se van acidificando, lo que induce la maduración y/o activación de procatepsina L o procatepsina B y la degradación del vitelo (Fagotto, 1990; Nordin *et al.*, 1991; Cho *et al.*, 1999; Yamahama *et al.*, 2003). La estrecha relación entre la acidificación de los glóbulos de vitelo y la activación de la hidrólisis de las proteínas almacenadas también se ha descrito en anfibios (Fagotto y Maxfield, 1994b) y en el erizo de mar (Mallya *et al.*, 1992). En esta última especie, la actividad de una proteasa similar a la catepsina B parece que está regulada por cambios en el pH.

Recientes estudios en teleósteos pelagófilos y bentófilos sugieren que el inicio de la hidrólisis del vitelo durante la maduración del oocito podría estar también controlado por cambios en el pH. En el serrano estriado (*Centropristis striata*), especie pelagófila, Selman *et al.* (2001) han demostrado que la bafilomicina A1, un compuesto que a concentración nanomolar inhibe la actividad de la V-ATPasa, bloquea la hidrólisis de lipovitelina, el incremento en FAA y la hidratación del oocito *in vitro*. Sin embargo, la bafilomicina A1 aparentemente no afecta la progresión de la meiosis ni la disgregación de las estructuras cristalinas y fusión de los glóbulos de vitelo en el oocito. Unos efectos similares se han observado en folículos ováricos de dorada incubados *in vitro* con 17,20 β P y bafilomicina A1 (Fabra *et al.*, 2006). Estos datos son por tanto consistentes con la hipótesis de que la acidificación de los glóbulos de vitelo por la V-ATPasa es un mecanismo necesario para activar la



hidrólisis de las proteínas del vitelo en los oocitos de teleósteos pelagófilos. La acumulación de iones K^+ en el oocito durante la maduración, que no es afectada por la bafilomicina A1, podría ser el responsable de la disgregación de las inclusiones cristalinas de los glóbulos de vitelo, haciendo de este modo accesibles a las catepsinas las proteínas de su interior (Selman *et al.*, 2001). No obstante, los mecanismos específicos que controlan la activación de las catepsinas en oocitos pelagófilos son todavía desconocidos.

Mediante la utilización de la sonda de pH ácido N-(3-((2,4-dinitrofenil)-amino)propil)-N-(3-aminopropil)-metilamina, dihidrocloro (DAMP), se ha demostrado en el fúndulo que los inhibidores de la V-ATPasa bafilomicina A1 y concanamicina A bloquean la acidificación de los glóbulos de vitelo (Raldúa *et al.*, 2006). En esta especie, la acidificación de los glóbulos parece ocurrir en oocitos postvitelogénicos antes de la maduración, lo que posiblemente esté asociado con una cierta hidrólisis de las proteínas almacenadas (Selman y Wallace, 1986). La activación de la maduración del oocito por el MIS acelera la escisión de la LvH1 de 122 kDa, y este proceso es completamente bloqueado por los inhibidores de la V-ATPasa (Raldúa *et al.*, 2006). El aumento de pH en los glóbulos de vitelo como consecuencia de la acción de la bafilomicina A1 inhibe la actividad de la catepsina B *in vitro*, lo que indica que en el fúndulo esta proteasa es muy probablemente regulada por la V-ATPasa y responsable de la hidrólisis de la LvH1 (Raldúa *et al.*, 2006). No obstante, se desconoce si la catepsina B está localizada en el citoplasma del oocito o dentro de los glóbulos de vitelo, como parece ser el caso para la catepsina D en la trucha (Sire *et al.*, 1994), donde podría ser activada simplemente por cambios en el pH o por la acción de otra cisteína proteasa. Las catepsinas normalmente se liberan a los lisosomas como proenzimas (Hasilik, 1992), y como la bafilomicina A1 suprime indirectamente la fusión de los lisosomas con las vacuolas diana (Pillay *et al.*, 2002), la posibilidad de una inhibición de la liberación de la catepsina B a los glóbulos de vitelo durante la maduración del oocito podría también ser factible. Por tanto, es claro que los detalles de la regulación de las catepsinas B y L en los oocitos de teleósteos, incluyendo los mecanismos hormonales para la activación de la V-ATPasa, son todavía muy desconocidos y deben de ser investigados en un futuro.



6.4.3. Iones inorgánicos y otros efectores osmóticos de bajo peso molecular

Los primeros estudios realizados para investigar los mecanismos fisiológicos implicados en la hidratación del oocito de peces sugerían que el aumento intracelular de iones K^+ y Na^+ podía significar la principal fuerza osmótica para permitir el influjo de agua (Hirose y Ishida, 1974; Hirose, 1976; Babiker y Ibrahim, 1979). En especies bentófilas, estudios más recientes han proporcionado evidencias convincentes del papel de estos iones durante la hidratación del oocito (Cuadro 3). En el fúndulo, tanto el K^+ como el Na^+ están presentes en concentraciones relativamente elevadas tanto en folículos ováricos justo después de la maduración como en huevos no fertilizados, siendo estas concentraciones más elevadas que las de FAA (Greeley *et al.*, 1991). Además, los cambios en la concentración de K^+ en particular van en paralelo con las variaciones en la osmolalidad del oocito. Estas observaciones se han confirmado mediante experimentos *in vitro*, los cuales indican que el contenido en Na^+ y K^+ de los folículos del fúndulo aumenta pro-

CUADRO 3.

Cantidad total y concentración de iones inorgánicos en oocitos inmaduros (O) y huevos (H) de peces bentófilos y pelagófilos.

Especie	Na+				K+				Referencia
	nmol/ind		mM		nmol/ind		mM		
	O	H	O	H	O	H	O	H	
Bentófilos de agua dulce									
<i>Plecoglossus altivelis</i>	70	176	116	221	50	39	128	10	Chen <i>et al.</i> (2003)
Bentófilos marinos									
<i>Fundulus heteroclitus</i>	25	85	25	40	49	180	42	80	Wallace <i>et al.</i> (1992)
Pelagófilos marinos									
<i>Centropristis striata</i>	5	9	214	22	4	21	200	51	Selman <i>et al.</i> (2001)
<i>Cynoscion nebulosus</i>	2	3	72	30	3	7	110	61	LaFleur y Thomas (1991)
<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	125	150	37	11	300	1,200	88	85	Finn <i>et al.</i> (2002a)
<i>Micropogonias undulatus</i>	1	2	60	35	2	7	70	65	LaFleur y Thomas (1991)
<i>Sparus aurata</i>	11	7	90	20	13	57	110	56	Fabra <i>et al.</i> (2006)

Las concentraciones están calculadas a partir del volumen del oocito y el huevo. Los datos de contenido en Na^+ y K^+ están expresados en nmol/mg oocito.



gresivamente con el incremento de volumen durante la maduración (Wallace *et al.*, 1992). El aumento de K^+ es aproximadamente el doble que el de Na^+ y excede al del agua, con lo que al final de la maduración se observa un incremento neto en la concentración de K^+ . En estos trabajos también se ha demostrado que en esta especie la hidratación del oocito *in vitro* es estrictamente dependiente de la concentración de K^+ en el medio de cultivo, lo que sugiere que este ion es el principal responsable de la hidratación. Sin embargo, durante la maduración del oocito de otras especies bentófilas que se reproducen en agua dulce o en áreas de baja salinidad, como el ayu, sólo se observa un aumento de Na^+ (Chen *et al.*, 2003). Curiosamente, en esta especie también se ha descrito que existe un segundo incremento de Na^+ durante la oviposición asociado con un aumento del volumen y contenido de agua del oocito. Todas estas observaciones sugieren que en especies bentófilas la acumulación de Na^+ o K^+ en el oocito durante la maduración puede depender de la salinidad de las áreas de reproducción (Chen *et al.*, 2003). Esta interesante hipótesis, no obstante, todavía no se ha demostrado.

En especie pelagófilas, el K^+ también se ha relacionado con el aumento de la osmolalidad de los oocitos durante la hidratación (Cuadro 3). En dos especies de corvina, *Micropogonias undulatus* y *Cynoscion nebulosus*, LaFleur y Thomas (1991) han demostrado un aumento de K^+ , pero no de Na^+ , durante la maduración del oocito, aunque también se ha encontrado un incremento de Mg^{2+} y Ca^{2+} . Al igual que en el fúndulo, la hidratación del oocito de estas especies *in vitro* es dependiente de la concentración de K^+ en el medio de cultivo. En el oocito del serrano estriado y de la dorada, Selman *et al.* (2001) y Fabra *et al.* (2006), respectivamente, también han determinado una acumulación de K^+ y Na^+ , siendo la cantidad absoluta de K^+ de dos a seis veces mayor que la de Na^+ . No obstante, un estudio reciente en el fletán atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) demuestra que no sólo el K^+ contribuye al aumento de la hiperosmolaridad del oocito de especies pelagófilas sino también el Cl^- , amonio total (NH_4^+) y Pi , cuya cantidad absoluta aumenta durante las primeras fases de la hidratación del oocito (Finn *et al.*, 2002a). En esta especie, y posiblemente en otros teleósteos pelagófilos, los FAA derivados de la hidrólisis del vitelo contribuyen



aproximadamente con el 50 % de la osmolalidad del oocito, mientras que los iones, como el K^+ , Cl^- , Pi y NH_4^+ , completarían el 50 % restante (Finn *et al.*, 2002a).

En especies bentófilas, hay que señalar también que el sumatorio de las concentraciones de FAA, incluyendo taurina, K^+ y Na^+ suman como máximo el 55 % de la osmolalidad del oocito (Greeley *et al.*, 1991, Chen *et al.*, 2003). Por tanto, otros iones, como el Cl^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , HCO_3^- o HPO_3^- , y compuestos nitrogenados, como el NH_4^+ , podrían también funcionar como efectores osmóticos al igual que ocurre en oocitos de teleósteos pelagófilos. De hecho, los oocitos de ayu aumentan la concentración de Ca^{2+} unas 16 veces de magnitud durante la oviposición, aunque este aumento sólo alcanza una cuarta parte de los niveles de Na^+ (Chen *et al.*, 2003).

6.4.3.1. Mecanismos para el transporte de iones al oocito

En varias especies de teleósteos marinos, Craik (1982) y Craik y Harvey (1984, 1986) observaron una pronunciada disminución del fósforo unido a proteínas durante la maduración del oocito e hidrólisis de las proteínas del vitelo. En base a estos hallazgos estos autores propusieron que el fosfato unido a proteínas puede significar la fuente de energía para la masiva entrada de agua, implicando de este modo el papel de una ATPasa/bomba catiónica para el transporte de K^+ al interior del oocito. Este transporte activo parece necesario si se considera que el plasma posee una proporción Na^+/K^+ elevada, y por tanto el K^+ debe ser acumulado en el oocito contra gradiente. LaFleur y Thomas (1991) han proporcionado evidencias experimentales en favor de esta hipótesis al demostrar el papel de la ATPasa Na^+ , K^+ en la hidratación del oocito de dos especies de corvina. Además, estos autores observaron que la incubación de folículos ováricos en presencia de inhibidores de la ATPasa Na^+ , K^+ y de canales de Na^+ reduce la hidratación *in vitro*. En el ayu, también se ha sugerido que el sistema ATPasa Na^+ , K^+ podría estar implicado en el transporte de Na^+ al oocito durante la oviposición (Chen *et al.*, 2003).

En el fúndulo, por el contrario, no se han obtenido evidencias experimentales de la existencia de una ATPasa Na^+ , K^+ en folículos ováricos. Wallace *et al.* (1992) observaron que concentraciones relativamente



altas de ouabaina (10^{-5} M), un potente inhibidor de ATPasas Na^+ , K^+ , u otros inhibidores de canales iónicos, no tienen ningún efecto sobre la hidratación del oocito in vitro. Estos resultados negativos aparentemente indican que la típica ATPasa Na^+ , K^+ no está implicada en la hidratación de los oocitos de fúndulo, lo que está de acuerdo con el hecho de que tanto el Na^+ como el K^+ se acumulan en el oocito durante la maduración. No obstante, cabe también considerar la presencia de ATPasas Na^+ , K^+ no sensibles a ouabaina.

Finalmente, para explicar el movimiento de Cl^- dentro del folículo ovárico de teleósteos se ha propuesto el papel de V-ATPasas, las cuales pueden transportar H^+ y Cl^- a través de membranas de lisosomas y endosomas (Finn *et al.*, 2002a). Asimismo, la presencia de canales de Na^+ (Bulling *et al.*, 2000) podría facilitar el flujo neto de Na^+ al oocito. No obstante, ninguno de estos mecanismos se ha demostrado todavía en el folículo ovárico de teleósteos.

6.4.3.2. Papel de la comunicación intercelular para la traslocación de iones K^+

Durante la búsqueda de los mecanismos celulares implicados en la acumulación de K^+ en el oocito del fúndulo, Wallace *et al.* (1992) hicieron dos observaciones remarcables. Primero, observaron que la habilidad del oocito dentro del folículo ovárico para hidratarse en respuesta al MIS in vitro es dependiente del estado específico de maduración, independientemente de la presencia de K^+ en el medio de cultivo, y en segundo lugar, vieron que los oocitos defoliculados (desprovistos de las células foliculares) pierden la habilidad para hidratarse. Estas observaciones están relacionadas con el hecho de que durante la maduración, a la vez que el oocito se prepara para la ovulación, el oocito y las células de la granulosa retraen las microvellosidades, rompiéndose de este modo la comunicación química entre las dos células (Cerdà *et al.*, 1999; Bolamba *et al.*, 2003). Este mecanismo podría ser la causa de la pérdida gradual de la habilidad del oocito para hidratarse durante la maduración, lo que es consistente con el hecho de que la conexión del oocito con las células de la granulosa es esencial para la hidratación del oocito.

Como ya se ha mencionado, la comunicación intercelular entre el oocito y las células de la granulosa está mediada por diferentes estruc-

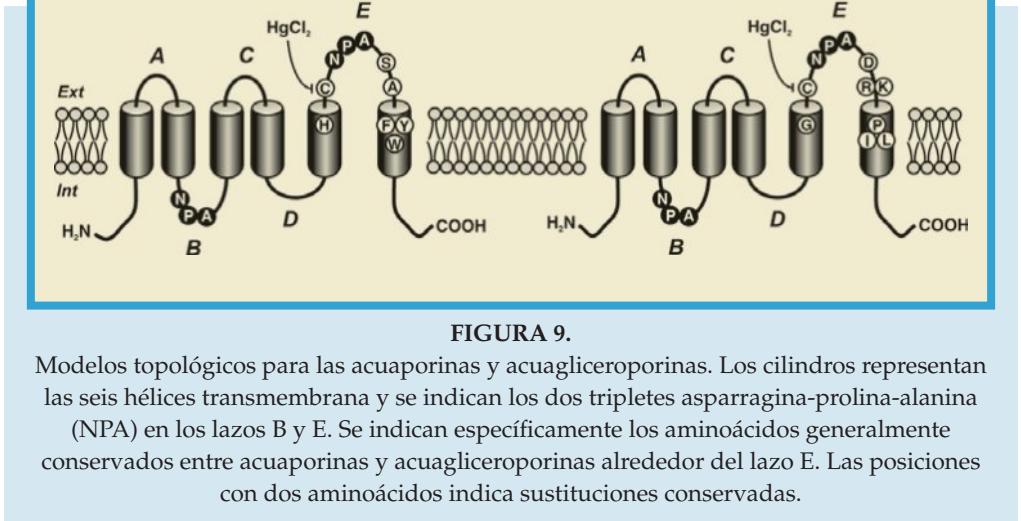


turas de contacto celular, y entre ellas, las uniones íntimas, las cuales permiten el paso de moléculas de menos de 1.200 Da desde una célula a otra. Por tanto, es posible que en el fúndulo el K^+ acumulado en las células de la granulosa sea transportado al oocito mediante las uniones íntimas, las cuales se desconectan a medida que madura el oocito (Wallace *et al.*, 1992). Mediante el uso del «lucifer yellow» (LY), un colorante fluorescente que es impermeable a las células y que sólo puede transferirse a través de las uniones íntimas, se han obtenido evidencias que apoyan esta hipótesis (Cerdà *et al.*, 1993). La inyección de LY en el oocito postvitelógeno efectivamente se transfiere a las células de la granulosa, demostrando de este modo la existencia de uniones íntimas heterólogas funcionales entre estas células y el oocito. El paso de LY, y por tanto la comunicación intercelular, es inhibida por compuestos que bloquean las uniones íntimas, como el forfol 12-miristato 13-acetato (PMA) y el 1-octanol. Ambos compuestos reducen además considerablemente la hidratación del oocito *in vitro* iniciada por el MIS, lo que apoya el papel de las uniones íntimas para el transporte de K^+ desde las células de la granulosa al oocito. Estos hallazgos sugieren que el paso de K^+ hacia el oocito del fúndulo podría ser un proceso pasivo desde las células de la granulosa hacia el oocito a través de las uniones íntimas. Como se ha comentado anteriormente, la hidrólisis de las proteínas del vitelo podría ayudar a que el K^+ sea acumulado en el oocito al crearse un gradiente electroquímico.

En especies pelagófilas no se ha demostrado todavía un mecanismo mediado por uniones íntimas para el transporte de iones al oocito. No obstante, en estas especies si se ha observado el paso de LY entre las células de la granulosa y el oocito en folículos postvitelogénicos (Yoshizaki *et al.*, 2001), lo que sugiere la presencia de uniones íntimas funcionales. Durante el proceso de adquisición de la competencia para la maduración por el oocito en respuesta a la LH, se observa un aumento de ARNm de proteínas formadoras de las uniones íntimas (conexinas) y de los contactos intercelulares entre el oocito y las células de la granulosa (Chang *et al.*, 2000; Choi y Takashima, 2000; Yoshizaki *et al.*, 2001; Bolamba *et al.*, 2003), lo que podría ser consistente con un papel de las uniones íntimas en la acumulación de K^+ en el oocito.

Durante mucho tiempo se ha asumido que el transporte de agua al oocito durante la maduración ocurría por simple difusión a través de las membranas lipídicas. Sin embargo, el descubrimiento de los canales moleculares de agua, o acuaporinas, en prácticamente todos los organismos vivos (Agre *et al.*, 2002) ha llevado recientemente a investigar con más detalle los mecanismos moleculares implicados en la hidratación del oocito de teleósteos marinos.

La acuaporinas son proteínas de la membrana celular que transportan agua según la dirección del gradiente osmótico. El tamaño de las acuaporinas suele oscilar entre 250 y 300 aminoácidos. Muy hidrofóbicas, estas proteínas se organizan en seis segmentos de estructura α -hélice que atraviesan la membrana de lado a lado, unidos por cinco lazos conectores (A-E) (Fig. 9). Dos de los lazos (uno extracelular, E, y otro intracelular, B) se pliegan hacia la membrana y se aproximan para formar el poro por donde pasa el agua (Agre *et al.*, 2002). Este





particular plegamiento, en forma de reloj de arena, pone en contacto los tripletes asparragina-prolina-alanina (NPA) para formar el sitio más estrecho del poro. En el lazo E, cercano al triplete NPA, se encuentra una cisteína que es la responsable de la sensibilidad de muchas acuaporinas a compuestos de mercurio. Aunque cada acuaporina constituye por sí sola un canal, estas proteínas pueden ensamblarse en grupos de cuatro en la membrana celular.

Actualmente se conocen 13 acuaporinas distintas en mamíferos, mientras que las plantas presentan la mayor variedad con 35 representantes (Agree *et al.*, 2002; Chrispeels *et al.*, 2001). En base a las propiedades de permeabilidad de las acuaporinas cuando se expresan artificialmente en oocitos de *X. laevis*, estas se pueden dividir en dos subgrupos: aquellas que son sólo permeables al agua (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, y AQP8), y aquellas que son también permeables a la urea, el glicerol y a otros solutos de tamaño reducido (AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10), y que se denominan acuagliceroporinas (Agre *et al.*, 2002). La acuaporina-6 (AQP6) es una acuaporina particular ya que aunque transporta ligeramente agua, también funciona como un canal iónico con selectividad para aniones. Algunas acuaporinas son también permeables a otros solutos, como la AQP9, la cual puede transportar arsenito y una variedad de solutos no cargados, la AQP1, que puede transportar CO₂, y la AQP8, que puede transportar NH₄⁺/NH₃. Las AQP11 y AQP12 no presentan los típicos tripletes NPA y sus propiedades de permeabilidad no están bien determinadas, aunque al menos la AQP11 sí parece transportar agua (Yakata *et al.*, 2006).

6.4.4.2. Funciones fisiológicas de las acuaporinas

En mamíferos, las acuaporinas están distribuidas por todos los tejidos y tipos celulares, incluyendo el ovario (Takata *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de su extensa distribución, la función fisiológica de la mayoría de estas proteínas es muy desconocida. El análisis de la secuencia del genoma de algunas especies de teleósteos, como el pez cebra, revela la existencia de unas 17 acuaporinas distintas, siendo funcionales la mayoría de ellas cuando se expresan en oocitos de *X. laevis* (Calusinska, Tingaud-Sequeira y Cerdà, datos no publicados). En esta especie no existen los genes de AQP2, AQP5 y AQP6 típicos de



mamíferos. Sin embargo, se observan duplicaciones de algunos de los otros genes, las cuales no han ocurrido en mamíferos, lo que resulta en un número elevado de acuaporinas. La distribución similar de acuaporinas en el genoma de teleósteos y mamíferos puede sugerir la existencia de funciones equivalentes, aunque las propiedades específicas de las acuaporinas de teleósteos son todavía muy desconocidas. En el fúndulo, no obstante, se ha clonado el homólogo de la AQP0 de mamíferos la cual se expresa específicamente en el cristalino del ojo y posee una elevada permeabilidad al agua y cierta permeabilidad al CO₂ pero no al glicerol o la urea (Virkki *et al.*, 2001). En la dorada se ha aislado una acuagliceroporina similar a la AQP10 de mamíferos la cual es permeable al agua, glicerol y urea, y se expresa de forma elevada en el intestino posterior y el riñón (Santos *et al.*, 2004). En la anguila (*Anguilla anguilla*), se han encontrado dos AQP1 distintas (AQP1 y AQP1dup) y la AQP3, las cuales también se localizan en órganos osmoreguladores, como el intestino posterior y las branquias, y cuya expresión parece encontrarse bajo regulación osmótica (Cutler y Cramb, 2002; Lignot *et al.*, 2002; Aoki *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2005). No obstante, a pesar de estos estudios, la función fisiológica de las acuaporinas en órganos osmoreguladores de teleósteos es prácticamente desconocida.

6.4.4.3. Papel de las acuaporinas durante la hidratación del oocito

Recientemente, Fabra *et al.* (2005) han planteado la hipótesis de que la elevada hidratación del oocito de la dorada (ver Cuadro 1), que ocurre durante aproximadamente 2 h, podría estar facilitada por la presencia de acuaporinas. Para demostrar esta hipótesis se han empleado tecnologías de PCR con las cuales se ha aislado una acuaporina del ovario (FABRA *et al.*, 2005). El análisis de la secuencia de aminoácidos de esta proteína indica la presencia de seis segmentos transmembrana y dos tripletes NPA, que son las características típicas de las proteínas de la superfamilia de las acuaporinas. La secuencia de aminoácidos de este péptido muestra una elevada homología con la AQP1 de mamíferos, así como los residuos típicamente conservados entre las acuaporinas selectivas de agua. De acuerdo con esto, la expresión del correspondiente ARNc en oocitos de *X. laevis* confiere permeabilidad



específica de los oocitos al agua, la cual puede ser inhibida por HgCl_2 y tetraetilamonio (TEA), de modo similar a lo que ocurre con la AQP1 de mamíferos. Sin embargo, la homología de la acuaporina del ovario de la dorada con la AQP1 de mamíferos es relativamente baja. Además, a diferencia de la AQP1, la acuaporina de la dorada se expresa en muy pocos tejidos y de forma predominante en el ovario. Estas observaciones han llevado a denominar a esta acuaporina como SaAQP1o (acuaporina del ovario de *S. aurata*).

Experimentos de inmunocitoquímica empleando anticuerpos específicos han demostrado que la SaAQP1o se localiza exclusivamente en el oocito en el ovario. La SaAQP1o se detecta por primera vez en el citoplasma de oocitos previtelogénicos, y a medida que avanza la vitelogenénesis, la proteína aparece en la zona más periférica del citoplasma del oocito (Fabra *et al.*, 2005, 2006). Durante la maduración e hidratación del oocito, justo cuando aparentemente se crea la presión osmótica más elevada en el oocito como resultado de la acumulación de iones y FAA, la SaAQP1o es traslocada a las microvellosidades del oocito que atraviesan la zona pelúcida, donde puede actuar en el transporte de agua (Fabra *et al.*, 2006). Esta regulación intracelular de la SaAQP1o durante la maduración del oocito podría ser consistente con su papel en la hidratación. Para demostrar esta hipótesis se han llevado a cabo experimentos *in vitro* en los cuales folículos ováricos de dorada son inducidos a la maduración e hidratación con $17,20\beta\text{P}$ en presencia de inhibidores de la SaAQP1o, como el HgCl_2 y TEA. Los resultados de estos experimentos indican que ambos compuestos reducen la hidratación de los oocitos *in vitro* con un efecto dependiente de la dosis del inhibidor, y en el caso del HgCl_2 , la inhibición puede ser revertida con β -mercaptoetanol (Fabra *et al.*, 2005, 2006). Estas observaciones, por tanto, proporcionan evidencias de la función de la SaAQP1o durante la hidratación del oocito de la dorada, posiblemente facilitando el flujo de agua al interior del oocito.

La identificación de la SaAQP1o ha contribuido a esclarecer uno de los mecanismos moleculares esenciales para la adquisición de la flotabilidad de los huevos en teleósteos pelagófilos. Este descubrimiento sugiere que el proceso de hidratación del oocito es en realidad un mecanismo muy controlado, basado en la hidrólisis de las proteínas



del vitelo para la creación del gradiente osmótico y la SaAQP1o para el transporte de agua (Fig. 10). Mediante el análisis del genoma de especies de teleósteos y la clonación de ADNc por PCR, recientemente se han aislado acuaporinas similares a la SaAQP1o en otras especies de teleósteos (Tingaud-Sequeira *et al.*, datos no publicados). El análisis filogenético de todas las secuencias AQP1, o similares, de vertebrados revela que la AQP1o posiblemente se ha originado a partir de una duplicación local de un gen *AQP1* ancestral. Esta duplicación aparentemente sólo ha ocurrido de forma temprana durante la evolución de los teleósteos, ya que los anfibios, aves y mamíferos no poseen ningún gen *AQP1o*. En teleósteos, la duplicación del gen *AQP1* ancestral dio lugar a los genes *aqp1a* y *aqp1b*, siendo este último el gen inicialmente denominado *AQP1o*, a lo que posiblemente siguió una serie de mutaciones en la secuencia de nucleótidos especialmente en la región codificadora del extremo C terminal de la proteína. En especies de teleósteos pelagófilas marinas y catádrómas (que viven en agua dulce pero que se reproducen en el mar) el ARNm de *aqp1b* se expresa predominantemente en el ovario al igual que en la dorada, lo que sugiere que la Aqp1b podría estar también implicada en la hidratación del oocito. Por el contrario, en especies bentófilas dulceacuícolas, como el pez cebra o el medaka, el gen *aqp1b* se expresa en muy pocos tejidos con niveles muy bajos o desaparece del genoma. Estos datos sugieren por tanto que la Aqp1b es posiblemente el producto de un gen único en teleósteos «neofuncionalizado» en los oocitos de especies marinas y adaptado para el transporte de agua.

6.5. REGULACIÓN DE LA OVULACIÓN

Inmediatamente después de la maduración y la hidratación del oocito, ocurre la ovulación, durante la cual se produce la liberación del oocito maduro de las células foliculares que lo envuelven. La ovulación sigue a la disrupción de las conexiones celulares entre el oocito y las células de la granulosa (separación folicular) que ocurre durante la maduración, e implica la rotura de la pared folicular que rodea al oocito (ruptura folicular) y la expulsión activa del oocito al oviducto. Estos procesos están regulados por diferentes moléculas, como proteasas,

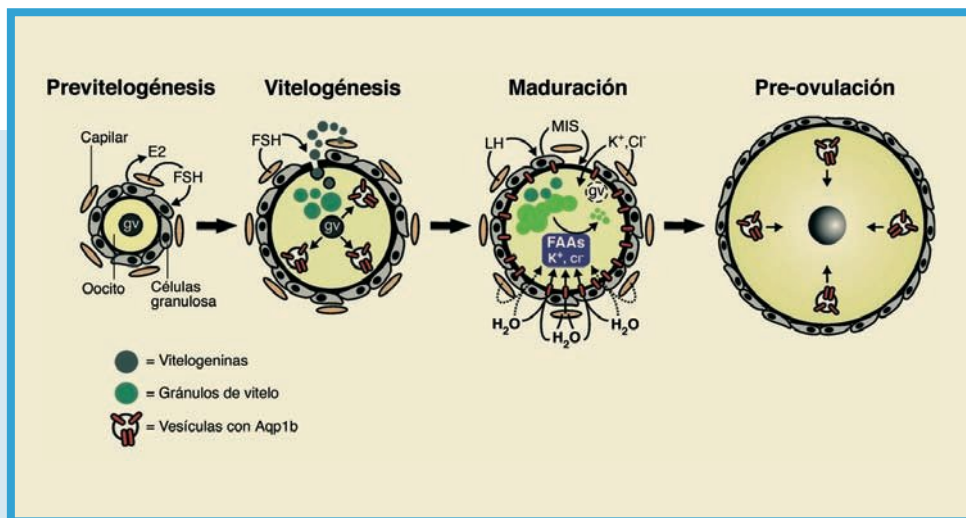


FIGURA 10.

Modelo de los principales procesos fisiológicos durante la hidratación del oocito en teleósteos pelagófilos. Durante la previtelogénesis, las células foliculares asociadas al oocito sintetizan 17β-estradiol (E2) en respuesta a la hormona folículo estimulante (FSH), la cual estimulará al hígado para que produzca y libere vitelogeninas (Vg). Durante el crecimiento del oocito (vitelogénesis), las Vg se incorporan en el oocito por un mecanismo de endocitosis mediado por receptor, que parece ser también regulado por la FSH. Las Vg se hidrolizan inmediatamente dando lugar a varias proteínas del vitelo las cuales se almacenan en glóbulos. Al inicio de la vitelogénesis la acuaporina Aqp1b se sintetiza en el oocito y se transporta en el interior de vesículas hacia la membrana plasmática del oocito. Durante la maduración, las células de la granulosa son estimuladas por la hormona luteinizante (LH) para que produzcan el MIS y se inicie la progresión de la meiosis. Durante este proceso la vesícula germinal (GV) migra hacia el polo animal del oocito y se rompe, los glóbulos de vitelo se fusionan unos con otros y se activa la hidrólisis de las proteínas del vitelo con producción de aminoácidos libres (FAA). Al mismo tiempo, algunos iones inorgánicos, como el K⁺, se incorporan desde el medio externo y se acumulan en el oocito. En este momento, la Aqp1b se inserta en la membrana plasmática del oocito, donde puede actuar en el transporte de agua hacia el interior de este (líneas sólidas) dirigido por la presión osmótica creada por el incremento de FAA e iones inorgánicos. El flujo de agua hacia el oocito también puede ocurrir por simple difusión a través de las membranas de las células foliculares y del oocito (líneas de puntos). Cuando finaliza la hidrólisis, la Aqp1b es retirada de la membrana del oocito y cesa la hidratación. Modificado de Fabra *et al.* (2006).



inhibidores de proteasas, progestágenos, eicosanoides, catecolaminas y péptidos vasoactivos (Goetz *et al.*, 1991). No obstante, tanto en mamíferos como en peces, existen todavía muchas cuestiones no resueltas sobre los mecanismos moleculares implicados en la ovulación, especialmente sobre las vías bioquímicas que unen las señales hormonales con las moléculas efectoras finales, como las proteasas responsables de la ruptura folicular.

La ovulación de folículos ováricos de teleósteos se puede inducir *in vitro* empleando LH, hCG o extractos de pituitaria, o con MIS. La respuesta que se obtiene es sin embargo variable dependiendo de la especie. Por ejemplo, en la perca (*Perca flavescens*), los oocitos maduran y ovulan *in vitro* después de la estimulación con MIS, mientras que los oocitos de trucha o pez cebra prácticamente no ovulan *in vitro* (Goetz *et al.*, 1991; Selman *et al.*, 1994). No obstante, en otras especies, como la dorada, la ovulación *in vitro* puede ocurrir espontáneamente si los oocitos han iniciado el proceso de maduración en el ovario antes de ser extraídos de las hembras. Por tanto, es posible que ciertos procesos clave esenciales para conseguir la ovulación puede que no sean activados *in vitro* por el MIS. En este contexto, la ovulación parece un proceso más delicado que la maduración, lo que podría estar de acuerdo con datos que sugieren que la ovulación en peces, a diferencia de la maduración, es regulada por mecanismos genómicos que implican la síntesis de novo de RNAm (Theofan y Goetz, 1981; Pinter y Thomas, 1999). Además, ambas vías intracelulares para la maduración y ovulación deben de estar coordinadas para asegurar el momento óptimo para la maduración y ovulación (Liu *et al.*, 2005).

6.5.1. Mecanismos moleculares durante la ovulación

A partir de estudios en varias especies es conocido que el ácido araquidónico y sus metabolitos, incluyendo las prostaglandinas, están implicados en el mecanismo de la ovulación. Así, en la perca, inhibidores de la prostaglandina endoperóxido sintasa bloquea la ovulación *in vitro* de folículos estimulados con el MIS, y el grado de inhibición está correlacionado con la reducción en la síntesis de prostaglandina en el ovario (Bradley y Goetz, 1994; Goetz y Garczynski, 1997). Asimismo, en la corvina (*M. undulatus*) parece que las vías metabólicas de la ci-



clooxigenasa y lipooxigenasa que implican a la PKC y el ácido araquidónico y prostaglandinas están involucradas en la ovulación (Patiño *et al.*, 2003), aunque la posición relativa de cada vía de señalización parece ser distinta que en la perca (Bradley y Goetz, 1994). En la lubina (*Dicentrarchus labrax*) se ha visto que ciertas prostaglandinas pueden también intervenir en el proceso de maduración del oocito iniciado por la LH *in vitro* (Sorbera *et al.*, 2001).

La ovulación tiene lugar por la ruptura del folículo causada por la disolución parcial de la membrana basal y la zona pelúcida. Por tanto, es posible asumir la implicación de enzimas proteolíticos en este proceso. De hecho, se han propuesto varias proteasas como responsables de la ruptura folicular, aunque la identificación precisa de los principales enzimas no ha sido posible de momento. Recientemente, Ogiwara *et al.* (2005) han identificado un proceso bioquímico muy próximo al mecanismo de rotura del folículo utilizando un sistema *in vitro* de ovulación en el medaka. Este estudio indica la función de la gelatinasa A en la hidrólisis de colágeno tipo IV, que forma parte de la membrana basal, y de la metaloproteinasa (MMP) tipo 2 para la degradación de colágeno tipo I presente en la capa de las células de la teca. En otro trabajo, mediante la secuenciación de genotecas substraídas de ADNc construidas a partir de ARN de oocitos maduros y ovulados de trucha de arroyo, se ha aislado el ARNm codificante de un inhibidor de proteasas, similar a las antileucoproteinasas de mamíferos, el cual se acumula en el folículo durante la ovulación (Goetz y Garczynski, 1997). Aunque la función de esta proteasa todavía no ha sido descubierta es posible que esté involucrada en la regulación de la proteólisis durante la ovulación.

6.6. ASPECTOS APLICADOS EN ACUICULTURA

La investigación que se ha llevado a cabo en los últimos años ha aumentado considerablemente nuestro conocimiento sobre los mecanismos biológicos implicados en la formación de los gametos femeninos de teleósteos. La aplicación de técnicas de biología molecular, y más recientemente de la genómica funcional y proteómica, está contribuyendo enormemente a este nuevo conocimiento proporcionando in-



formación sobre genes y redes de regulación génica esenciales durante la formación de los gametos. De este modo, esta información puede facilitar el desarrollo de nuevas aplicaciones no sólo en el campo de la acuicultura sino también en el de la evaluación del impacto medioambiental. A continuación veremos algunas de estas aplicaciones que inciden sobre dos aspectos esenciales en piscicultura: la disponibilidad de biomarcadores de calidad de los huevos y el desarrollo de métodos para la conservación de gametos a largo plazo.

6.6.1. Biomarcadores de calidad de gametos

El uso de biomarcadores para estimar la viabilidad del huevo y sus consecuencias sobre el futuro desarrollo del embrión y los alevines es de una gran importancia para la acuicultura. Estos marcadores pueden ser extremadamente útiles para no malgastar esfuerzos produciendo larvas de baja calidad en los criaderos comerciales. Sin embargo, salvo algunas excepciones, en teleósteos se carece de marcadores bioquímicos fiables para evaluar la calidad de los huevos. Algunos estudios recientes empleando genómica funcional han identificado algunos ARNm en la trucha arcoiris que parecen acumularse durante los procesos de maduración gonadal y de sobreovulación, los cuales podrían emplearse como marcadores de buena y mala calidad de los huevos, respectivamente (Bobe *et al.*, 2004, 2006; Aegerter *et al.*, 2005). Si bien esta información es muy útil para identificar genes implicados en caracteres complejos de interés productivo, la determinación de estos ARN en los criaderos comerciales puede ser compleja y costosa debido a las técnicas moleculares que deben de ser empleadas. No obstante, se han descrito algunos factores implicados en el proceso de maduración de los oocitos de teleósteos que podrían ofrecer métodos más sencillos para evaluar la viabilidad de los huevos.

6.6.1.1. MPF

El nivel de actividad enzimática del MPF puede ser empleado para estimar la calidad de los huevos. Como se ha mencionado, la actividad del MPF, que es determinada por su capacidad de fosforilar la histona H1 como sustrato exógeno, oscila de acuerdo con el ciclo celular meiótico del oocito, siendo elevada en metafase y muy baja en la inter-



fase (Yamashita *et al.*, 1992b). Así, los oocitos maduros (huevos no fertilizados) que tienen la meiosis detenida en metafase II muestran una alta actividad del MPF. Cuando los huevos son fertilizados, la actividad del MPF disminuye de forma drástica, y el ciclo celular es liberado de la metafase y procede hacia la interfase. De acuerdo con este modelo, se puede asumir que los huevos que exhiben poca actividad del MPF, aunque puedan salir del arresto en metafase II, mostrarán un pobre desarrollo embrionario. De hecho, los huevos embrionados de trucha que muestran niveles bajos de ARNm de ciclina B no se desarrollan correctamente (Aegerter *et al.*, 2005). En oocitos de porcino incubados *in vitro* la disminución de la actividad del MPF, que parecer ser causada por una fosforilación de la Cdc2 con efectos inhibitorios, es actualmente empleada para evaluar la calidad de los huevos y la incidencia de activación partenogenética (Kikuchi *et al.*, 1999). La medida de la actividad quinasa del MPF se realiza normalmente empleando radioisótopos, pero puede realizarse también mediante un anticuerpo capaz de reconocer la secuencia de péptidos de la histona H1 específicamente fosforilada por el MPF (Yamashita *et al.*, 1992b), lo que facilitaría su análisis en criaderos comerciales. Asimismo, como el arresto meiótico en metafase II es también dependiente de Mos y MAPK, sería posible estimar la calidad del huevo midiendo la actividad de estas moléculas (Suwa and Yamashita, 2007).

6.6.1.2. Catepsinas

En teleósteos pelagófilos, la producción de cantidades elevadas de huevos embrionados no flotantes, en los cuales el desarrollo embrionario se detiene, representa uno de los factores limitantes más importantes en el control de la reproducción de estas especies. En la dorada, Carnevali *et al.* (2001a) sugieren que la causa más probable de la ausencia de desarrollo embrionario en los huevos no flotantes es el bajo nivel de hidratación que tienen. Estos huevos muestran una hidrólisis parcial de las proteínas del vitelo, lo que posiblemente explica su baja hidratación. La degradación incompleta del vitelo podría ser debida a un funcionamiento erróneo de las catepsinas durante la maduración del oocito, ya que los huevos no flotantes presentan niveles inusualmente altos de catepsina L y D con respecto a los huevos embrionados



hidratados y flotantes (Carnevali *et al.*, 2001a). La determinación de la actividad enzimática de la catepsina L podría ser por tanto un buen indicador de la viabilidad de los huevos embrionados de dorada.

6.6.1.3. Apoptosis

La muerte celular programada, o apoptosis, es un mecanismo iniciado por una gran variedad de estímulos fisiológicos que lleva a la destrucción organizada de la célula. Tanto en mamíferos como en teleósteos, el proceso de atresia de los folículos ováricos, mediante el cual los oocitos no alcanzan la maduración y son reabsorbidos, incluye la activación de mecanismos de apoptosis (Habibi y Andreu-Vieyra, 2007). La presencia de atresia en el ovario de teleósteos se asocia a condiciones ambientales adversas o a cambios en los niveles fisiológicos de algunas hormonas. Durante la apoptosis de oocitos de ratón, la estimulación de Fas, el «receptor de muerte celular», por su ligando activa diversas proteasas (e.g., caspasas) y produce la fragmentación del ADN internucleosomal que ocurre típicamente durante el proceso de muerte celular (Hussein, 2005). En huevos no flotantes de dorada se ha demostrado una elevada expresión de Fas y su ligando, juntamente con fragmentación de ADN y un hinchamiento de las mitocondrias (Carnevali *et al.*, 2003). Estas observaciones pueden indicar la presencia de apoptosis en huevos no flotantes de teleósteos pelagófilos. La apoptosis en el oocito podría ser activada por la catepsina D, ya que esta proteasa es uno de los mediadores positivos de los procesos apoptóticos y muestra una alta actividad en los huevos no flotantes (Carnevali *et al.*, 2001a, 2003). Aunque las causas de la activación de vías apoptóticas en huevos de teleósteos no están claras, estos hallazgos en la dorada sugieren que la detección de Fas y/o su ligando podría emplearse como un biomarcador de calidad del huevo.

6.6.2. Acuaporinas y criopreservación de gametos

La preservación a largo plazo de oocitos de teleósteos, mediante métodos de criopreservación, para la conservación del genoma materno ofrece algunas ventajas respecto al empleo de embriones. Los oocitos tienen un tamaño menor que los huevos y embriones, lo que determina una relación superficie-volumen más favorable, y por tanto,



podría facilitar los movimientos de agua y agentes criopreservantes (CPA). Además, los oocitos están desprovistos de un corion completamente formado, a diferencia de los huevos y embriones, que impide el paso de sustancias desde el embrión al exterior y viceversa. No obstante, los oocitos de teleósteos presentan de por sí una baja permeabilidad a los CPA, una alta sensibilidad al enfriamiento y un gran contenido de vitelo y agua (oocitos maduros pelagófilos) (Zhang *et al.*, 2007). Debido a todos estos factores, que dificultan enormemente un proceso de congelación viable, la criopreservación de oocitos de teleósteos todavía no se ha conseguido.

Para mejorar la permeabilidad de los oocitos de peces se ha probado de introducir CPA en el oocito mediante presión negativa o hidrostática, microinyección directa en el citoplasma y decorionización (Hagedorn *et al.*, 2002). Otra estrategia recientemente empleada es la modificación artificial de la permeabilidad de la membrana plasmática del oocito mediante la expresión de acuagliceroporinas de mamíferos, como la AQP3. Algunas acuagliceroporinas son permeables, además de al agua, el glicerol y la urea, a solutos no cargados (carbamidas, polioles, purinas y pirimidinas), incluyendo algunos CPAs, como el polipropilenglicol (PG) y el etilenglicol (e.g., Tsukaguchi *et al.*, 1999). En embriones de pez cebra, la sobreexpresión de AQP3 de rata aumenta la permeabilidad al agua y PG, elevando el contenido de este CPA en el saco de vitelo (Hagedorn *et al.*, 2002). Asimismo, en el medaka, la inyección de ARNc de AQP3 de rata aumenta la permeabilidad al agua y CPA de oocitos postvitelogénicos (Valdez *et al.*, 2006). Sin embargo, el aumento de permeabilidad de los oocitos postvitelogénicos de medaka después de la expresión de AQP3 podría no ser suficientemente elevada para mejorar la supervivencia de los oocitos después de la criopreservación, ya que estos son unas 1000 veces más grandes que los de mamíferos, y la sobreexpresión de AQP3 sólo incrementa aproximadamente dos veces su permeabilidad (Valdez *et al.*, 2006).

Los oocitos de teleósteos poseen una baja proporción superficie-volumen y una permeabilidad al agua muy limitada, y por tanto muestran bajas velocidades críticas de congelación (Mazur, 2004). Estas características de los oocitos contribuyen a la formación de cristales intracelulares durante la congelación, que son los causantes de la muerte celular. Ello



es debido a que durante los estados de subenfriamiento, cuando el oocito tiende a deshidratarse por el gradiente químico creado entre el medio extracelular y el intracelular, la salida de agua se produce a una velocidad muy lenta. Por tanto, es posible que la sobreexpresión de acuaporinas selectivas de agua en el oocito de peces, como la AQP1, la cual transporta agua de un modo más eficiente que las acuagliceroporinas, pueda mejorar la salida de agua del oocito facilitando así la criopreservación. Esta hipótesis, aunque no se ha demostrado todavía, está también fundamentada en estudios llevados a cabo en la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) donde se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la tolerancia al frío y la expresión natural o artificial de acuaporinas (Tanghe *et al.*, 2002). Así, niveles altos de acuaporinas en la membrana plasmática de las células de levadura parece que permiten un rápido flujo de agua al exterior, especialmente a bajas temperaturas, lo que reduce la formación de cristales intracelulares.

El descubrimiento de la Aqp1b en el oocito de teleósteos pelagófilos abre la posibilidad de emplear este canal de agua para la criopreservación de oocitos inmaduros, los cuales muestran un bajo contenido en agua y por tanto pueden ser más adecuados para la congelación. Estos métodos podrían basarse en el control de la acumulación de la Aqp1b en la membrana plasmática de los oocitos con el fin de aumentar su permeabilidad al agua. Este mecanismo podría también emplearse para acumular acuagliceroporinas y así mejorar la permeabilidad de los oocitos a CPAs. Es evidente, no obstante, que esta estrategia requiere un conocimiento de los procesos intracelulares implicados en el transporte de acuaporinas en el oocito de teleósteos, los cuales están siendo actualmente investigados.

BIBLIOGRAFÍA

- AEGERTER, S., B. JALABERT y J. BOBE, 2005. Large scale real-time PCR analysis of mRNA bundance in rainbow trout eggs in relationship with egg quality and post-ovulatory ageing. *Mol. Reprod. Dev.* 72: 377-385.
- AGRE, P., S. L. KING, M. YASUI, W. B. GUGGINO, O.P. OTTERSEN, Y. FUJIYOSHI, A. ENGEL y S. NIELSEN, 2002. Aquaporin water channels ñ from atomic structure to clinical medicine. *J. Physiol.* 542: 3-16.



- AGUADO, L. I., 2002. Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. *Microsc. Res. Tech.* 59: 462-473.
- ANDREU-VIEYRA, C. V., A. G. BURET y H. R. HABIBI, 2005. Gonadotropin-releasing hormone induction of apoptosis in the testes of goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* 146: 1588-1596.
- AOKI, M., T. KANEKO, F. KATOH, S. HASEGAWA, N. TSUTSUI y K. AIDA, 2003. Intestinal water absorption through aquaporin 1 expressed in the apical membrane of mucosal epithelial cells in seawater-adapted Japanese eel. *J. Exp. Biol.* 206: 3495-3505.
- BABIKER, M. M., y H. IBRAHIM, 1979. Studies on the biology of reproduction in the cichlid *Tilapia nilotica* (L.): effects of steroid and trophic hormones on ovulation and ovarian hydration. *J. Fish Biol.* 15: 21-30.
- BASU, D., A. K. NAVNEET, S. DASGUPTA y S. BHATTACHARYA, 2004. Cdc2-Cyclin B-induced G2 to M transition in perch oocyte is dependent on Cdc25. *Biol. Reprod.* 71: 894-900.
- BELLE, R., O. MINELLA, P. CORMIER, J. MORALES, R. POULHE y O. MULNER-LORILLON, 1995. Phosphorylation of elongation factor-1 (EF-1) by Cdc2 kinase. In: *Progress in Cell Cycle Research*. Vol. 1. pp. 265-270 (L. Meijer, S. Guidet y H.Y. L. Tung, eds). Plenum Press, New York.
- BOBE, J., G. MAUGARS, T. NGUYEN, H. RIME y B. JALABERT, 2003. Rainbow trout follicular maturational competence acquisition is associated with an increased expression of follicle stimulating hormone receptor and insulin-like growth factor 2 messenger RNAs. *Mol. Reprod. Devel.*, 66: 46-53.
- BOBE, J., T. NGUYEN y B. JALABERT, 2004. Targeted gene expression profiling in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary during maturational competence acquisition and oocyte maturation. *Biol. Reprod.* 71: 73-82.
- BOBE, J., J. MONTFORT, T. NGUYEN y A. FOSTIER, 2006. Identification of new participants in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) oocyte maturation and ovulation processes using cDNA microarrays. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4: 39.
- BOLAMBA, D., R. PATIÑO, G. YOSHIKAZI, y P. THOMAS, 2003. Changes in homologous and heterologous gap junction contacts during maturation-inducing hormone-dependent meiotic resumption in ovarian follicles of Atlantic croaker. *Gen. Comp. Endocrinol.* 131: 291-295.
- BRADLEY, J.A., y F. W. GOETZ, 1994. The inhibitory effect of indomethacin, nordihydroguaiaretic acid, and pyrrolidinedithiocarbamate on ovulation and prostaglandin synthesis in yellow perch (*Perca flavescens*) follicle incubates. *Prostaglandins* 48: 11-20.
- BULLING, A., F. D. BERG, U. BERG, D. M. DUFFY, R. L. STOFFER, S. R. OJEDA, M. GRATZL, y A. MAYERHOFER, 2000. Identification of an ovarian voltage-activated Na⁺-



- channel type: hints to involvement in luteolysis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 14: 1064-1974.
- BUZNIKOV, G.A., Y. B. SHMUKLER y J. M. LAUDER, 1996. From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? *Cell. Mol. Neurobiol.* 16: 533-559.
- CARNEVALI, O., G. MOSCONI, A. RONCARATI, P. BELVEDERE, M. ROMANO y E. LIMATOLA, 1992. Changes in the electrophoretic pattern of yolk proteins during vitellogenesis in the gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 955-962.
- CARNEVALI, O., G. MOSCONI, A. RONCARATI, P. BELVEDERE, E. LIMATOLA, y A. M. POLZONETTI-MAGNI, 1993. Yolk protein changes during oocyte growth in European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *J. Appl. Ichthyol.* 9: 175-184.
- CARNEVALI, O., R. CARLETTA, A. CAMBI, A. VITA, y N. BROMAGE, 1999a. Yolk formation and degradation during oocyte maturation in seabream *Sparus aurata*. Involvement of two lysosomal proteinases. *Biol. Reprod.* 60: 140-146.
- CARNEVALI, O., F. CENTONZE, S. BROOKS, I. MAROTA, y J. P. SUMPTER, 1999b. Molecular cloning and expression of ovarian cathepsin D in sea bream *Sparus aurata*. *Biol. Reprod.* 61: 785-791.
- CARNEVALI, O., G. MOSCONI, M. CARDINALI, I. MEIRI, y A. M. POLZONETTI-MAGNI, 2001a. Molecular components related to egg viability in the gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Mol. Reprod. Dev.* 58: 330-335.
- CARNEVALI, O., G. MOSCONI, A. CAMBI, S. RIDOLFI, S. ZANUY, A. M. POLZONETTI-MAGNI, 2001b. Changes of lysosomal enzyme activities in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) eggs and developing embryos. *Aquaculture* 202: 249-256.
- CARNEVALI, O., V. POLZONETTI, M. CARDINALI, A. PUGNALONI, P. NATALINI, N. ZMORA, G. MOSCONI, y A. M. POLZONETTI-MAGNI, 2003. Apoptosis in sea bream *Sparus aurata* eggs. *Mol. Reprod. Dev.* 66: 291-296.
- CERDÀ, J., T. R. PETRINO y R. A. WALLACE, 1993. Functional heterologous gap junctions in *Fundulus* ovarian follicles maintain meiotic arrest and permit hydration during oocyte maturation. *Dev. Biol.* 160: 228-235.
- CERDÀ, J., T. R. PETRINO, Y.-W. P. LIN y R. A. WALLACE, 1995. Inhibition of *Fundulus heteroclitus* oocyte maturation by serotonin (5-hydroxytryptamine). *J. Exp. Zool.* 273: 224-233.
- CERDÀ, J., K. SELMAN y R. A. WALLACE, 1996. Observations on oocyte maturation and hydration in vitro in the black sea bass, *Centropristis striata* (Serranidae). *Aquat. Living Res.* 9: 325-335.
- CERDÀ, J., T. R. PETRINO, M. J. GREENBERG, y R. A. WALLACE, 1997. Pharmacology of the serotonergic inhibition of steroid-induced reinitiation of oocyte meiosis in the teleost *Fundulus heteroclitus*. *Mol. Reprod. Dev.* 48: 282-291.



- CERDÀ, J., G. REICH, R. A. WALLACE y K. SELMAN, 1998a. Serotonin inhibition of steroid-induced meiotic maturation in the teleost *Fundulus heteroclitus*: Role of cyclic AMP and protein kinases. *Mol. Reprod. Dev.* 49: 333-341.
- CERDÀ, J., N. SUBHEDAR, G. REICH, R. A. WALLACE y K. SELMAN, 1998b. Oocyte sensitivity to serotonergic regulation during the follicular cycle of the teleost *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Reprod.* 59: 53-61.
- CERDÀ, J., S. REIDENBACH, S. PRÄTZEL, y W. W. FRANKE, 1999. Cadherin-catenin complexes during zebrafish oogenesis: heterotypic junctions between oocytes and follicle cells. *Biol. Reprod.* 61: 692-704.
- CHANG, X., R. PATIÑO, G. YOSHIZAKI, P. THOMAS, y V. H. LEE, 2000. Hormonal regulation and cellular distribution of connexin 32.2 and connexin 32.7 RNAs in the ovary of Atlantic croaker. *Gen. Comp. Endocrinol.* 120: 146-156.
- CHEN, Y.-N., S.-L. HSIEH y C.-M. KUO, 2003. Changes in oocyte and blood plasma osmotic components of ayu, *Plecoglossus altivelis* Temminck & Schlegel during oocyte maturation. *Aquacult. Res.* 34: 859-867.
- CHO, W. L., S. M. TSAO, A. R. HAYS, R. WALTER, J. S. CHEN, E. S. SNIGIREVSKAYA, y A. S. RAIKHEL, 1999. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J. Biol. Chem.* 274: 13311-13321.
- CHOI, C. Y., y F. TAKASHIMA, 2000. Molecular cloning and hormonal control in the ovary of connexin 31.5 mRNA and correlation with the appearance of oocyte maturational competence in red seabream. *J. Exp. Biol.* 203: 3299-3306.
- CHRISPEELS, M. J., R. MORILLON, C. MAUREL, P. GERBEAU, P. KJELLBOM, y I. JOHANSSON, 2001. Aquaporins of plants: structure, function, regulation, and role in plant water relations, pp 277-334. In: *Aquaporins. Current Topics in Membranes*, Vol. 51, editado por S. Hohmann, S. Nielsen y P. Agre. Academic Press.
- CRAIK, J. C. A., 1982. Levels of phosphoprotein in the eggs and ovaries of some fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B: 507-512.
- CRAIK, J. C. A., y S. M. HARVEY, 1984. Biochemical changes occurring during final maturation of eggs of some marine and freshwater teleosts. *J. Fish. Biol.* 24: 599-610.
- CRAIK, J. C. A., y S. M. HARVEY, 1986. Phosphorus metabolism and water uptake during final maturation of ovaries of teleosts with pelagic and demersal eggs. *Mar. Biol.* 90: 285-289.
- CRAIK, J. C. A., y S. M. HARVEY, 1987. The causes of buoyancy in eggs of marine teleosts. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 67: 169-182.
- CUTLER, C. P., y G. CRAMB, 2002. Branchial expression of an aquaporin 3 (AQP3) homologue is downregulated in the European eel, *Anguilla anguilla*, following seawater acclimation. *J. Exp. Biol.* 205: 2643-2651.



- DeManno, D. A., y F. W. Goetz, 1987a. The effects of forskolin, cAMP, and cyanoketone on steroid-induced meiotic maturation of yellow perch (*Perca flavescens*) oocytes in vitro. Gen. Comp. Endocrinol. 66: 233-243.
- DeManno, D. A., y F. W. Goetz, 1987b. Steroid-induced final maturation in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) oocytes in vitro: the effects of forskolin and phosphodiesterase inhibitors. Biol. Reprod. 36: 1321-1332.
- Edry I, S. Sela-Abramovich, y N. Dekel, 2006. Meiotic arrest of oocytes depends on cell-to-cell communication in the ovarian follicle. Mol. Cell. Endocrinol. 252: 102-106.
- Fabra, M., y J. Cerda, 2004. Ovarian cysteine proteinases in the teleost *Fundulus heteroclitus*: molecular cloning and gene expression during vitellogenesis and oocyte maturation. Mol. Reprod. Dev. 67: 282-294.
- Fabra, M., D. Raldúa, D. A. Power, P. M. T. Deen, y J. Cerda, 2005. Marine fish egg hydration is aquaporin-mediated. Science 307: 545.
- Fabra, M., D. Raldúa, M. G. Bozzo, P. M. T. Deen, E. Lubzens, y J. Cerda, 2006. Yolk proteolysis and aquaporin-1o play essential roles to regulate fish oocyte hydration during meiosis resumption. Dev. Biol. 295: 250-262.
- Fagotto, F., 1990. Yolk degradation in tick eggs: II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid-activatable proenzyme. Arch. Insect Biochem. Physiol. 14: 237-252.
- Fagotto, F., y F. R. Maxfield, 1994a. Yolk platelets in *Xenopus* oocytes maintain an acidic internal pH which may be essential for sodium accumulation. J. Cell Biol. 125: 1047-1056.
- Fagotto, F., y F. R. Maxfield, 1994b. Changes in yolk platelet pH during *Xenopus laevis* development correlate with yolk utilization. A quantitative confocal microscopy study. J. Cell Sci. 107: 3325-3337.
- FinN, R. N., G. C. Ostby, B. Norberg y H. J. Fyhn, 2002a. In vivo oocyte hydration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): proteolytic liberation of free amino acids, and ion transport, are driving forces for osmotic water influx. J. Exp. Biol. 205: 211-224.
- FinN, R. N., M. Wamboldt y H. J. Fyhn, 2002b. Differential processing of yolk proteins during hydration in marine fishes (Labridae) that spawn benthic and pelagic eggs. Mar. Ecol. Prog. Ser. 237: 217-226.
- Finet, B., B. Jalabert y S. K. Garg, 1988. Effect of defolliculation and 17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogesterone on cyclic AMP level in full-grown oocytes of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Gamete Res. 19: 241-252.
- Fugelli, K., y S. M. Thorøed, 1990. Taurine and volume regulation in fish cells. In Taurine: Functional Neurochemistry, Physiology and Cardiology (H. Pasan-



- tes-Morales, D. L. Martin, W. Shain, R. M. del Río, eds.), pp 481-488. New York: Wiley-Liss.
- GE, W., 2005. Intrafollicular paracrine communication in the zebrafish ovary: the state of the art of an emerging model for the study of vertebrate folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 237: 1-10.
- GEN, K., K. OKUZAWA, N. KUMAKURA, S. YAMAGUCHI y H. KAGAWA, 2001. Correlation between messenger RNA expression of cytochrome P450 aromatase and its enzyme activity during oocyte development in the red seabream (*Pagrus major*). *Biol. Reprod.* 65: 1186-1194.
- GIOACCHINI G, M. CARDINALI, F. MARADONNA, B. FUNKENSTEIN, G. MOSCONI y O. CARNEVALI, 2005. Hormonal control of the IGF system in the sea bream ovary. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040: 320-322.
- GOETZ, F.W., A. BERNDTSON y M. RANJAN, 1991. Ovulation: Mediators at the ovarian level. In: *Vertebrate Endocrinology, Fundamentals and Biomedical Implications*. Vol. 4 (A) - Reproduction. pp. 127-203. (P. Pang y M. Schreibman, eds.). Academic Press, New York.
- GOETZ, F. W., y M. GARCZYNSKI, 1997. The ovarian regulation of ovulation in teleost fish. *Fish Physiol. Biochem.* 17: 33-38.
- GRAY SL, B. A. ADAMS, C. M. WARBY, K. R. VON SCHALBURG y N. M. SHERWOOD, 2002. Transcription and translation of the salmon gonadotropin-releasing hormone genes in brain and gonads of sexually maturing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* 67: 1621-1627.
- GREELEY, M. S., D. R. CALDER y R.A. WALLACE, 1986. Changes in teleost yolk proteins during oocyte maturation: correlation of yolk proteolysis with oocyte hydration. *Comp. Biochem. Physiol.* 84B: 1-9.
- GREELEY, M. S., H. HOLS y R. A. WALLACE, 1991. Changes in size, hydration and low molecular weight osmotic effectors during meiotic maturation of *Fundulus* oocytes in vivo. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A: 639-647.
- GUTIÉRREZ, J., M. PÁRRIZAS, N. CARNEIRO, J. L. MAESTRO, M. A. MAESTRO y J. PLANAS, 1993. Insulin and IGF-I receptors and tyrosine kinase activity in carp ovaries: changes with reproductive cycle. *Fish Physiol. Biochem.* 11: 247-254.
- HABIBI, H.R., C. ANDREU-VIEYRA y E. MIRHADI, 2001. Functional significance of gonadal gonadotropin-releasing hormone pp 959-968. En: *Perspectives in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity*, editado por H.J.Th Goos, R.K. Rastogi, H Vaudry, R. Pierantoni. Monduzzi Editore, Bologna, Italy.
- HABIBI, H. R., y V. ANDREU-VIEYRA, 2007. Hormonal regulation of follicular atresia in teleost fish, pp 235-253. En *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*, edited by P. J. Babin, J. Cerdà and E. Lubzens. Springer, The Netherlands.



- HAGEDORN M, S. L. LANCE, D. M. FONSECA, F. W. KLEINHANS, D. ARTIMOV, R. FLEISCHER, A. T. M. S. HOQUE, M. B. HAMILTON y B. S. PU-KAZHENTHI, 2002. Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation. *Biol. Reprod.* 67: 961-966.
- HAIDER, S., 2003. Cyclic AMP level and phosphodiesterase activity during $17\alpha,20\beta$,dihydroxy-4-pregnen-3-one induction and theophylline inhibition of oocyte maturation in the catfish, *Clarias batrachus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 134: 267-274.
- HASILIK, A., 1992. The early an late processing of lysosomal enzymes: proteolysis and compartmentation. *Experientia* 48: 130-151.
- HILLIER, S.G., 2001. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 179: 39-46.
- HINCKLEY, M., S.VACCARI, K. HORNER, R. CHEN y M. CONTI, 2005. The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. *Dev. Biol.* 287: 249-261.
- HIRAI, T., M. YAMASHITA, M. YOSHIKUNI, T. TOKUMOTO, H. KAJIURA, N. SAKAI y Y. NAGAHAMA, 1992. Isolation and characterization of goldfish cdk2, a cognate variant of the cell cycle regulator cdc2. *Dev. Biol.* 152: 113-120.
- HIRAMATSU, N., N. ICHIKAWA, H. FUKADA, T. FUJITA, C. V. SULLIVAN y A. HARA, 2002a. Identification and characterization of proteases involved in specific proteolysis of vitellogenin and yolk proteins in salmonids. *J. Exp. Zool.* 292: 11-25.
- HIRAMATSU, N., A. HARA, K. HIRAMATSU, H. FUKADA, G. M. WEBER, N. D. DENSLOW y C. V. SULLIVAN, 2002b. Vitellogenin-derived yolk proteins of white perch, *Morone americana*: purification, characterization, and vitellogenin-receptor binding. *Biol. Reprod.* 67: 655-667.
- HIROSE, K., 1976. Endocrine control of ovulation in medaka (*Oryzias latipes*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*). *J. Fish. Res. Board Can.* 33: 989-994.
- HIROSE, K., y R. ISHIDA, 1974. Effects of cortisol and human chorionic gonadotropin (hCG) on ovulation in ayu, *Plecoglossus altivelis* (Temminck and Schlegel), with special respect to waterf and ion balance. *J. Fish Biol.* 6: 557-564.
- HORIGUCHI, R., M. YOSHIKUNI, M. TOKUMOTO, Y. NAGAHAMA y T. TOKUMOTO, 2005. Identification of a protein kinase which phosphorylates a subunit of the 26S proteasome and changes in its activity during meiotic cell cycle in goldfish oocytes. *Cell Signal.* 17: 205-215.
- HUSSEIN, M. R., 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update.* 11:162-77.
- INGS, J. S., y G. VAN DER KRAAK, 2006. Characterization of the mRNA expression of StAR and steroidogenic enzymes in zebrafish ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 943-54.



- IWAMATSU T, Y. TOYA, H. OUCHI, T. AOYAMA, J. YONEIMA, T. KONDO, K. IMAI, H. HATTORI, S. IKEGAMI, y M. ONDA, 1992a. Characterization of a low molecular weight factor in chicken serum with oocyte maturation-inducing activity. *Biomed. Res.* 13: 429-437.
- IWAMATSU, T., S. Y. TAKAHASHI, T. OH-ISHI, T. YOKOCHI y H. MAEDA, 1992b. Changes in electrophoretic patterns of oocyte proteins during oocyte maturation in *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* 34: 173-179.
- IWAMATSU, T., Y. TOYA, N. SAKAI, Y. TERADA, R. NAGATA, y Y. NAGAHAMA, 1993. Effect of 5-hydroxytryptamine on steroidogenesis and oocyte maturation in preovulatory follicles of the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev. Growth Differ.* 35: 625-630.
- IWAMATSU, T., Y. SHIBATA y M. YAMASHITA, 1999. Studies on fertilization of the teleost. II. Nuclear behavior and changes in histone H1 kinase. *Dev. Growth Differ.* 41: 473-482.
- JALABERT, B., y B. FINET, 1986. Regulation of oocyte maturation in rainbow trout, *Salmo gairdneri*: role of cyclic AMP in the mechanism of action of maturation inducing steroid (MIS), 17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogesterone. *Fish Physiol. Biochem.* 2: 65-74.
- JARED, D. W., y R. A. WALLACE, 1968. Comparative chromatography of the yolk proteins of teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 24: 437-443.
- JIANG, J. Q., M. YAMASHITA, M. YOSHIKUNI, S. FUKADA y Y. NAGAHAMA, 1996. Organization of cytoplasmic microtubules during maturation of goldfish oocytes. *Zool. Sci.* 13: 899-907.
- KAGAWA, H., H. TANAKA, K. OKUZAWA y K. HIROSE, 1994. Development of maturational competence of oocytes of red seabream, *Pagrus major*, after human chorionic gonadotropin treatment in vitro requires RNA and protein synthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94: 199-206.
- KAGAWA, H., S. MORIYAMA y H. KAWAUCHI, 1995. Immunocytochemical localization of IGF-I in the ovary of the red seabream, *Pagrus major*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99: 307-315.
- KAJIURA-KOBAYASHI, H., N. YOSHIDA, N. SAGATA, M. YAMASHITA y Y. NAGAHAMA, 2000. The Mos/MAPK pathway is involved in metaphase II arrest as a cytostatic factor but is neither necessary nor sufficient for initiating oocyte maturation in goldfish. *Dev. Genes Evol.* 210: 416-425.
- KATSU, Y., M. YAMASHITA, H. KAJIURA y Y. NAGAHAMA, 1993. Behavior of the components of maturation-promoting factor, Cdc2 kinase and Cyclin B, during oocyte maturation of goldfish. *Dev. Biol.* 160: 99-107.
- KATSU, Y., M. YAMASHITA, T. HIRAI, T. TOKUMOTO, H. KAJIURA y Y. NAGAHAMA, 1995. Molecular Cloning and immunological analysis of goldfish Cyclin A during oocyte maturation. *Dev. Biol.* 170: 616-625.



- KATSU, Y., M. YAMASHITA y Y. NAGAHAMA, 1997. Isolation and characterization of goldfish Y box protein, a germ-cell specific RNA-binding protein. *Eur. J. Biochem.* 249: 854-861.
- KATSU, Y., M. YAMASHITA y Y. NAGAHAMA, 1999. Translational regulation of Cyclin B mRNA by 17 α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (maturation-inducing hormone) during oocyte maturation in a teleost fish, the goldfish (*Carassius auratus*). *Mol. Cell. Endocrinol.* 158: 79-85.
- KESTEMONT, P., J. COOREMANS, A. ABI-AYAD y C. MÉLARD, 1999. Cathepsin L in eggs and larvae of perch *Perca fluviatilis*: variations with developmental stage and spawning period. *Fish Physiol. Biochem.* 21: 59-64.
- KIKUCHI, K., K. NAITO, J. NOGUCHI, A. SHIMADA, H. KANEKO, M. YAMASHITA, H. TOJO y Y. TOYODA, 1999. Inactivation of p34cdc2 kinase by the accumulation of its phosphorylated forms in porcine oocytes matured and aged in vitro. *Zygote* 7: 173-179.
- KIME, D.E., 1993. Classical and non-classical reproductive steroids in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 3: 160-180.
- KJØRSVIK, E., A. MANGOR-JENSEN y I. HOMEFJORD, 1990. Egg quality in fishes. *Adv. Mar. Biol.* 26: 71-113.
- KOBAYASHI, W., 1985. Communications of oocyte-granulosa cells in the chum salmon ovary detected by transmission electron microscopy. *Dev. Growth Differ.* 27: 553-561.
- KONDO, T., T. YANAGAWA, N. YOSHIDA y M. YAMASHITA, 1997. Introduction of Cyclin B induced activation of the maturation-promoting factor and breakdown of germinal vesicle in growing zebrafish oocytes unresponsive to the maturation-inducing hormone. *Dev. Biol.* 190: 142-152.
- KONDO, T., T. KOTANI y M. YAMASHITA, 2001. Dispersion of Cyclin B mRNA aggregation is coupled with translational activation of the mRNA during zebrafish oocyte maturation. *Dev. Biol.* 229: 421-431.
- KOTANI, T., y M. YAMASHITA, 2002. Discrimination of the roles of MPF and MAP kinase in morphological changes that occur during oocyte maturation. *Dev. Biol.*, 252: 271-286.
- KUMAR, R.S., S. IJIRI y J. M. TRANT, 2000. Changes in the expression of genes encoding steroidogenic enzymes in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary throughout a reproductive cycle. *Biol. Reprod.* 63: 1676-1682.
- KWON, J. Y., F. PRAT, C. RANDALL y C. TYLER, 2001. Molecular characterization of putative yolk processing enzymes and their expression during oogenesis and embryogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.* 65: 1701-1709.



- LAFLÉUR, G. J. JR., B. M. BYRNE, J. KANUNGO, L. D. NELSON, R. M. GREENBERG y R. A. WALLACE, 1995a. *Fundulus heteroclitus* vitellogenin: the deduced primary structure of a piscine precursor to non-crystalline, liquid-phase yolk protein. *J. Mol. Evol.* 41: 505-521.
- LAFLÉUR, G. J. JR., B. M. BYRNE, C. HAUX, M. A. GREENBERG y R. A. WALLACE, 1995b. A. Liver-derived cDNAs: vitellogenin and vitelline envelope proteins precursors (choriogenins), pp 336-338. En: *Proceedings of the Fifth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, editado por F. W. Goetz y P. Thomas. Univ. of Texas, Austin.
- LAFLÉUR, G. J. JR., D. RALDÚA, M. FABRA, O. CARNEVALI, N. DENSLOW, R. A. WALLACE y J. CERDÀ, 2005. Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenins and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Reprod.* 73: 815-824.
- LEE, B. H., E. H. LIM, T. J. LAM y J. L. DING, 1994. Two major groups of vitellogenin cDNA clones from *Oreochromis aureus* (Steindacher). *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34: 75-83.
- LETHIMONIER, C., T. MADIGOU, J. A. MUÑOZ-CUETO, J. J. LAREYRE y O. KAH, 2004. Evolutionary aspects of GnRHs, GnRH neuronal systems and GnRH receptors in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 135: 1-16.
- LIGNOT, J. H., C. P. CUTLER, N. HAZON y G. CRAMB, 2002. Immunolocalization of aquaporin-3 in the gill and the gastrointestinal tract of the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *J. Exp. Biol.* 205: 2653-2663.
- LING, G. N., 1990. The physical state of potassium ion in the living cell. *Scanning Microsc.* 4: 737-750.
- LIU, X. S., C. MA, A.-W. HAMAM y X. J. LIU, 2005. Transcription-dependent and transcription-independent functions of the classical progesterone receptor in *Xenopus* ovaries. *Dev. Biol.* 283: 180-190.
- MAESTRO, M. A., E. MÉNDEZ, M. PARRIZAS y J. GUTIÉRREZ, 1997. Characterization of insulin and insulin-like growth factor-I ovarian receptors during the reproductive cycle of carp (*Cyprinus carpio*). *Biol. Reprod.* 56: 1126-1132.
- MAESTRO, M. A., E. MÉNDEZ, J. V. PLANAS y J. GUTIÉRREZ, 1999. Dynamics of insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) ovarian receptors during maturation in the brown trout (*Salmo trutta*). *Fish Physiol. Biochem.* 20: 341-349.
- MALLER, J. L., 1995. Maturation-promoting factor in the early days. *Trends Biochem. Sci.* 20: 524-528.
- MALLYA, S., J. S. PARTIN, M. C. VALDIZAN y W. J. LENNARZ, 1992. Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. *J. Cell Biol.* 117: 1211-1221.



- MARTÍNEZ, A. S., C. P.CUTLER, G. D.WILSON, C.PHILLIPS, N. HAZON y G. CRAMB, 2005. Cloning and expression of three aquaporin homologues from the European eel (*Anguilla anguilla*): effects of seawater acclimation and cortisol treatment on renal expression. *Biol. Cell.* 97: 615-27.
- MATSUBARA, T., y K. SAWANO, 1995. Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*). *J. Exp. Zool.* 272: 34-45.
- MATSUBARA, T., y Y. KOYA, 1997. Course of proteolytic cleavage in three classes of yolk proteins during oocyte maturation in barfin flounder *Verasper moseri*, a marine teleost spawning pelagic eggs. *J. Exp. Zool.* 278: 189-200.
- MATSUBARA, T., S. ADACHI, S. IJIRI y K. YAMAUCHI, 1995. Change of lipovitellin during in vitro oocyte maturation in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.* 61: 478-481.
- MATSUBARA, T., N. OHKUBO, T. ANDOH, C. V. SULLIVAN y A. HARA, 1999. Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev. Biol.* 213: 18-32.
- MATZUK, M. M., K. H. BURNS, M. M. VIVEIROS y J. J. EPPIG, 2002. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296: 2178-80.
- MAZUR, P., 2004. Principles of cryobiology, pp 3-65. En *Life in the Frozen State*, editado por B. J. Fuller, N. Lane y E. E. Benson. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida,.
- MCPHERSON, R., M. S. JR.GREELEY y R. A. WALLACE, 1989. The influence of yolk protein proteolysis on hydration in the oocytes of *Fundulus heteroclitus*. *Develop. Growth Differ.* 31: 475-483.
- MELLINGER, J., 1994. La flottabilité des oeufs des téléostéens. *LiAnné Biologique* 33: 117-138.
- MURAKAMI, M., I. IUCHI y K. YAMAGAMI, 1990. Yolk phosphoprotein metabolism during early development of the fish, *Oryzias latipes*. *Develop Growth Differ.* 32: 619-627.
- NAGAHAMA, Y., y S. ADACHI, 1985. Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Dev. Biol.* 109: 428-435.
- NAGAHAMA, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38: 217-229.
- NAGAHAMA, Y., 1997. $17\alpha,20\beta$ -Dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62: 190-196.



- NAKAMURA, I., J. C. EVANS, M. KUSAKABE, Y. NAGAHAMA y G. YOUNG, 2005. Changes in steroidogenic enzyme and steroidogenic acute regulatory protein messenger RNAs in ovarian follicles during ovarian development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Gen. Comp. Endocrinol. 144: 224-231.
- NIKITINA, L. A., L. A. MALCHENKO, N. A. TEPLITS y G. A. BUZNIKOV, 1988. Effects of serotonin and its analogues on in vitro maturation of amphibian oocytes. Ontogenez 19: 499-507.
- NIKITINA, L. A., O. B. TRUGNIKOVA y G. A. BUZNIKOV, 1993. Effects of neurotransmitters and their antagonists on oocyte maturation. The effect of serotonin antagonists on in vitro oocyte maturation in amphibians. Ontogenez 24: 29-38.
- NISSLING, A., A. MÜLLER y H.-H. HINRICHSSEN, 2003. Specific gravity and vertical distribution of sprat eggs in the Baltic sea. J. Fish Biol. 63: 280-299.
- NORDIN, J. H., E. L. BEAUDOIN y X. LIU, 1991. Identification of yolk granules in *Blattella germanica* eggs coincident with proteolytic processing of vitellin. Arch. Insect Biochem. Physiol. 18: 177-192.
- OKA, Y., M. YOSHIKUNI, M. TANAKA, M. MITA y Y. NAGAHAMA, 1997. Inhibitory guanine-nucleotide-binding-regulatory protein alpha subunits in medaka (*Oryzias latipes*) oocytes. cDNA cloning and decreased expression of proteins during oocyte maturation. Eur. J. Biochem. 249: 846-853.
- OKA, Y., T. HIRAI, Y. YOSHIURA, T. KOBAYASHI y Y. NAGAHAMA, 2001. Fish gonadotropin and thyrotropin receptors: the evolution of glycoprotein hormone receptors in vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem Mol Biol. 129: 441-448.
- OGIWARA, K., N. TAKANO, M. SHINOHARA, M. MURAKAMI y T. TAKAHASHI, 2005. Gelatinase A and membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 are responsible for follicle rupture during ovulation in the medaka. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 8442-8447.
- OHKUBO, N., y T. MATSUBARA, 2002. Sequential utilization of free amino acids, yolk proteins and lipids in developing eggs and yolk-sac larvae of barfin flounder *Verasper moseri*. Mar. Biol. 140: 187-196.
- OHTA, K., y M. MATSUYAMA, 2002. Steroidogenic pathways to 17,20-dihydroxy-4-pregnen-3-one and 17,20,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in the ovarian follicles of the bambooleaf wrasse *Pseudolabrus sieboldi*. Fish. Sci. 68: 41-50.
- OKUMURA, H., T. KAYABA, Y. KAZETO, A. HARA, S. ADACHI y K. YAMAUCHI, 1995. Changes in the electrophoretic patterns of lipovitellin during oocyte development in the Japanese eel *Anguilla japonica*. Fish Sci 61:529-530 (1995).
- ONITAKE, K., y T. IWAMATSU, 1986. Immunocytochemical demonstration of steroid hormones in the granulosa cells of the medaka, *Oryzias latipes*. J. Exp. Zool. 239: 97-103.



- OSHIRO, T., y T. HIBIYA, 1981a. Water absorption of oocytes in the plaice *Limanda yokohamae* during meiotic maturation and its role in rupturing follicles. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 47:835-841 (1981a).
- OSHIRO, T., y T. HIBIYA, 1981b. Relationship of yolk globules fusion to oocyte water absorption in the plaice *Limanda yokohamae* during meiotic maturation. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 47: 1123-1130.
- PACE, M. C., y P. THOMAS, 2005. Activation of a pertussis toxin-sensitive, inhibitory G-protein is necessary for steroid-mediated oocyte maturation in spotted seatrout. Dev. Biol. 285: 70-79.
- PATI, D., y H. R. HABIBI, 2002. Involvement of protein kinase C and arachidonic acid pathways in the gonadotropin-releasing hormone regulation of oocyte meiosis and follicular steroidogenesis in the goldfish ovary. Biol. Reprod. 66: 813-822.
- PATÍÑO, R., G. YOSHIZAKI, P. THOMAS y H. KAGAWA, 2001. Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 129: 427-439.
- PATÍÑO, R., G. YOSHIZAKI, D. BOLAMBA y P. THOMAS, 2003. Role of arachidonic acid and protein kinase C during maturation-inducing hormone-dependent meiotic resumption and ovulation in ovarian follicles of Atlantic croaker. Biol. Reprod. 68: 516-523.
- PETRINO, T. R., M. S. JR. GREELEY, K. SELMAN, Y.-W. LIN y R. A. WALLACE, 1989. Steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus*. II. Production of 17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone, testosterone, and 17 β -estradiol by various components of the ovarian follicle. Gen. Comp. Endocrinol. 76: 230-240.
- PINTER, J., y P. THOMAS, 1999. Induction of ovulation of mature oocytes by the maturation-inducing steroid 17 α , 20 β , 21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in the spotted seatrout. Gen. Comp. Endocrinol. 115: 200-209.
- PILLAY, C. S., E. ELLIOT y C. DENNISON, 2002. Endolysosomal proteolysis and its regulation. Biochem. J. 363: 417-429.
- PLANAS, J.V., J. ATHOS, F.W. GOETZ y P. SWANSON, 2000. Regulation of ovarian steroidogenesis in vitro by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone during sexual maturation in salmonid fish, Biol. Reprod. 62: 1262-1269.
- PODRABSKY, J. E., J. F. CARPENTER y S. C. HAND, 2001. Survival of water stress in annual fish embryos: dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 280: R123-R131.
- RAMAKRISHNAPPA, N., R. RAJAMAHENDRAN, Y. M. LIN y P. C. LEUNG, 2005. GnRH in non-hypothalamic reproductive tissues. Anim. Reprod. Sci. 88: 95-113.
- RALDÚA, D., M. FABRA, M. G. BOZZO, E. WEBER y J. CERDÀ, 2006. Cathepsin B-mediated yolk protein degradation during killifish oocyte maturation is blocked



- by a H⁺-ATPase inhibitor: Effects on the hydration mechanism. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290: R456-R466.
- REITH, M., J. MUNHOLLAND, J. KELLY, R. N. FINN y H. J. FYHN, 2001. Lipovitellins derived from two forms of vitellogenin are differentially processed during oocyte maturation in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *J. Exp. Zool.* 291: 58-67.
- ROGERS, S., R. WELLS y M. RECHSTEINER, 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368.
- SAGATA, N., 1996. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance. *Trends Cell Biol.* 6: 22-28.
- SAKAI, N., M. TANAKA, M. TAKAHASHI, S. FUKADA, J.I. MASON y Y. NAGAHAMA, 1994. Ovarian 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 -isomerase of rainbow trout: its cDNA cloning and properties of the enzyme expressed in a mammalian cell. *FEBS Lett.* 350: 309-313.
- SANTOS, C. R. A., M. D. ESTEVAO, J. FUENTES, J. C. R. CARDOSO, M. FABRA, A. L. PASSOS, F. J. DETMERS, P. M. T. DEEN, J. CERDÀ y D. M. POWER, 2004. Isolation of a novel aquaglyceroporin from a marine teleost (*Sparus auratus*): function and tissue distribution. *J. Exp. Biol.* 207: 1217-1227.
- SAWAGUCHI, S., H. KAGAWA, N. OHKUBO, N. HIRAMATSU, C. V. SULLIVAN y T. MATSUBARA, 2006. Molecular characterization of three forms of vitellogenin and their yolk protein products during oocyte growth and maturation in red seabream (*Pagrus major*), a marine teleost spawning pelagic eggs. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 719-736.
- SELMAN, K., y R. A. WALLACE, 1986. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *Am. Zool.* 26: 173-192.
- SELMAN, K., y R. A. WALLACE, 1989. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool. Sci.* 6: 211-231.
- SELMAN, K., R. A. WALLACE y V. BARR, 1986. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus* IV. Yolk-vesicle formation. *J. Exp. Zool.* 239: 277-288.
- SELMAN, K., R. A. WALLACE y V. BARR, 1988. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus* V. The relationship of yolk vesicles and cortical alveoli. *J. Exp. Zool.* 246: 42-56.
- SELMAN, K., R. A. WALLACE, A. SARKA y X. QI, 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. Morphol.* 218: 203-224.
- SELMAN, K., T. R. PETRINO y R. A. WALLACE, 1994. Experimental conditions for oocyte maturation in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. Exp. Zool.* 269: 538-550.
- SELMAN, K., R. A. WALLACE y J. CERDÀ, 2001. Bafilomycin A1 inhibits proteolytic cleavage and hydration but not yolk crystal disassembly and meiosis during maturation of sea bass oocytes. *J. Exp. Zool.* 290: 265-278.



- SEOKA, M., S. YAMADA, Y. IWATA, T. YANAGISAWA, T. NAKAGAWA y H. KUMAI, 2003. Differences in the biochemical content of buoyant and non-buoyant eggs of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 216: 355-362.
- SIRE, M. F., P. J. BABIN y J. M. VERNIER, 1994. Involvement of the lysosomal system in yolk protein deposit and degradation during vitellogenesis and embryonic development in trout. *J. Exp. Zool.* 269: 69-83.
- SIROTKIN AV, y H.-J. SCHAEFFER, 1997. Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. *J. Endocrinol.* 154: 1ñ5.
- SCHMIDT, A., N. R. RAUH, E. A. NIGG y T. U. MAYER, 2006. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *J. Cell Sci.* 119: 1213-1218.
- SCHNEIDER, W. J., 1996. Vitellogenin receptors: oocyte-specific members of the low-density lipoprotein receptor supergene family. *Int Rev Cytol.* 166: 103-37.
- SORBERA, L. A., J. F. ASTURIANO, M. CARRILLO y S. ZANUY, 2001. Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol Reprod.* 64: 382-389.
- SORENSEN, P.W., C.A. MURPHY, K. LOOMIS, P. MANIAK y P. THOMAS, 2004. Evidence that 4-pregnen-17,20β,21-triol-3-one functions as a maturation-inducing hormone and pheromonal precursor in the percid fish, *Gymnocephalus cernuus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139: 1-11.
- SUWA, K., y M. YAMASHITA, 2007. Regulatory mechanisms of oocyte maturation and ovulation, pp 323-347. En *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*, edited by P. J. Babin, J. Cerdà and E. Lubzens. Springer, The Netherlands.
- TAKATA, K., T. MATSUZAKI y Y. TAJIKA, 2004. Aquaporins: water channel proteins of the cell membrane. *Prog. Histochem. Cytochem.* 39: 1-83.
- TANAKA, M., T.M. TELECKY, S. FUKADA, S. ADACHI, S. CHEN y Y. NAGAHAMA, 1992. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P-450 aromatase (P450arom) from a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary; relationship between the amount of P450arom mRNA and the production of oestradiol-17β in the ovary. *J. Mol. Endocrinol.* 8: 53-61.
- TANAKA, M., S. NAKAJIN, D. KOBAYASHI, S. FUKADA, G. GUAN, T. TODO, B. SENTHILKUMARAN y Y. NAGAHAMA, 2002. Teleost ovarian carbonyl reductase-like 20β-hydroxysteroid dehydrogenase: potential role in the production of maturation-inducing hormone during final oocyte maturation. *Biol Reprod.* 66: 1498-504.
- TANAKA, T., y M. YAMASHITA, 1995. Pre-MPF is absent in immature oocytes of fishes and amphibians except *Xenopus*. *Dev. Growth Differ.* 37: 387-393.
- TANGHE A, P. VAN DUICK, F. DUMORTIER, A. TEUNISSEN, S. HOHMANN y J. M. THEVELEIN, 2002. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's



- yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5981-5989.
- TAYLOR, M. H., 1984. Lunar synchronization of fish reproduction. *Trans. Am. Fish. Soc.* 113: 484-493.
- THEOFAN, G., y F. W. GOETZ, 1981. The *in vitro* effects of actinomycin D and cycloheximide on germinal vesicle breakdown and ovulation of yellow perch (*Perca flavescens*) oocytes. *Comp. Biochem. Physiol. A* 69: 557-561.
- THOMAS, P., 1994. Hormonal control of final oocyte maturation in sciaenid fishes. In: Davey, K.G., Peter, R.E., Tobe, S.E. (Eds.), *Perspectives in Comparative Endocrinology*. National Research Council of Canada, Ottawa, pp. 619-625.
- THOMAS, P., J. PINTER y S. DAS, 2001. Upregulation of the maturation-inducing steroid membrane receptor in spotted seatrout ovaries by gonadotropin during oocyte maturation and its physiological significance. *Biol. Reprod.* 64: 21-29.
- THORSEN, A. y H. J. FYHN, 1996. Final oocyte maturation in vivo and in vitro in marine fishes with pelagic eggs; yolk protein hydrolysis and free amino acid content. *J. Fish Biol.* 48: 1195-1209.
- THORSEN, A., O. S. KJESBU, H. J. FYHN y P. SOLEMDAL, 1996. Physiological mechanisms of buoyancy in eggs from brackish water cod. *J. Fish Biol.* 48: 457-477.
- TINGAUD-SEQUEIRA, A., y J. CERDA, 2007. Phylogenetic relationships and gene expression pattern of three different cathepsin L (Ctsl) isoforms in zebrafish: Ctsla is the putative yolk processing enzyme. *Gene* 386: 98-106.
- TOKUMOTO, M., R. HORIGUCHI, M. YAMASHITA, Y. NAGAHAMA y T. TOKUMOTO, 1997a. Involvement of 26S proteasome in oocyte maturation of goldfish *Carassius auratus*. *Zool. Sci.* 14: 347-351.
- TOKUMOTO, T., M. YAMASHITA, M. TOKUMOTO, Y. KATSU, R. HORIGUCHI, H. KAJIURA y Y. NAGAHAMA, 1997b. Initiation of Cyclin B degradation by the 26S proteasome upon egg activation. *J. Cell Biol.* 138: 1313-1322.
- TOKUMOTO, M., Y. NAGAHAMA y T. TOKUMOTO, 2002. A major substrate for MPF: cDNA cloning and expression of polypeptide chain elongation factor 1 gamma from goldfish (*Carassius auratus*). *DNA seq.* 13: 27-31.
- TOKUMOTO, M., Y. NAGAHAMA, P. THOMAS y T. TOKUMOTO, 2006. Cloning and identification of a membrane progesterin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 145: 101-108.
- TSUKAGUCHI, H., S. WEREMOWICZ, C. C. MORTON y M. A. HEDIGER, 1999. Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am. J. Physiol.* 277: F685-F696.



- TUNQUIST, B. J., y J. L. MALLER, 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev.* 17: 683-710.
- TYLER, C. R., y J. P. SUMPTER, 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 6: 287-318.
- UZBEKOVA, S., J. LAREYRE, Y. GUIGUEN, F. FERRIERE, T. BAILHACHE y B. BRETON, 2001. Expression of sGnRH mRNA in gonads during rainbow trout gametogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129: 457-65.
- UZBEKOVA, S., J. J. LAREYRE, T. MADIGOU, B. DAVAIL, B. JALABERT y B. BRETON, 2002. Expression of prepro-GnRH and GnRH receptor messengers in rainbow trout ovary depends on the stage of ovarian follicular development. *Mol. Reprod. Dev.* 62: 47-56.
- VALDEZ, D. M. JR., H. TAKAO, A. MIYAMOTO, S. SEKI, B. JIN, M. KASAI y K. EDASHISHE, 2006. Expression of aquaporin-3 improves the permeability to water and cryoprotectants of immature oocytes in the medaka (*Oryzias latipes*). *Cryobiology* 53: 160-168.
- VILAIN, J. P., M. MOREAU y P. GUERRIER, 1980. Uncoupling of oocyte-follicle cells triggers reinitiation of meiosis in amphibian oocytes. *Dev. Growth Differ.* 22: 687-691.
- VIRKKI, L. V., G. J. COOPER y W. F. BORON, 2001. Cloning and functional expression of a MIP (AQP0) homolog from killifish (*Fundulus heteroclitus*) lens. *Am. J. Physiol.* 281: R1994-R2003.
- WALLACE, R. A., 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates, Vol. 1, pp 127-177. En: *Developmental Biology*, editado por L.W. Browder. Plenum, New York.
- WALLACE, R. A., y K. SELMAN, 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Am. Zool.* 21: 325-343.
- WALLACE, R. A., y K. SELMAN, 1985. Major proteins changes during vitellogenesis and maturation of *Fundulus* oocytes. *Dev. Biol.* 110: 492-498.
- WALLACE, R. A., y P. C. BEGOVAC, 1985. Phosvitins in *Fundulus* oocytes and eggs. Preliminary chromatographic and electrophoretic analyses together with biological considerations. *J. Biol. Chem.* 260: 11268-11274.
- WALLACE, R. A., y K. SELMAN, 1990. Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *J. Elec. Microsc. Tech.* 16: 175-201.
- WALLACE, R. A., M. S. JR. GREELEY y R. MCPHERSON, 1992. Analytical and experimental studies on the relationship between Na^+ , K^+ , and water-uptake during volume increases associated with *Fundulus* oocyte maturation in vitro. *J. Comp. Physiol.* 162B:241-248.
- WANG, H., J. T. TAN, A. EMELIANOV, V. KORZH y Z. GONG, 2005. Hepatic and extra-hepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene* 356: 91-100.



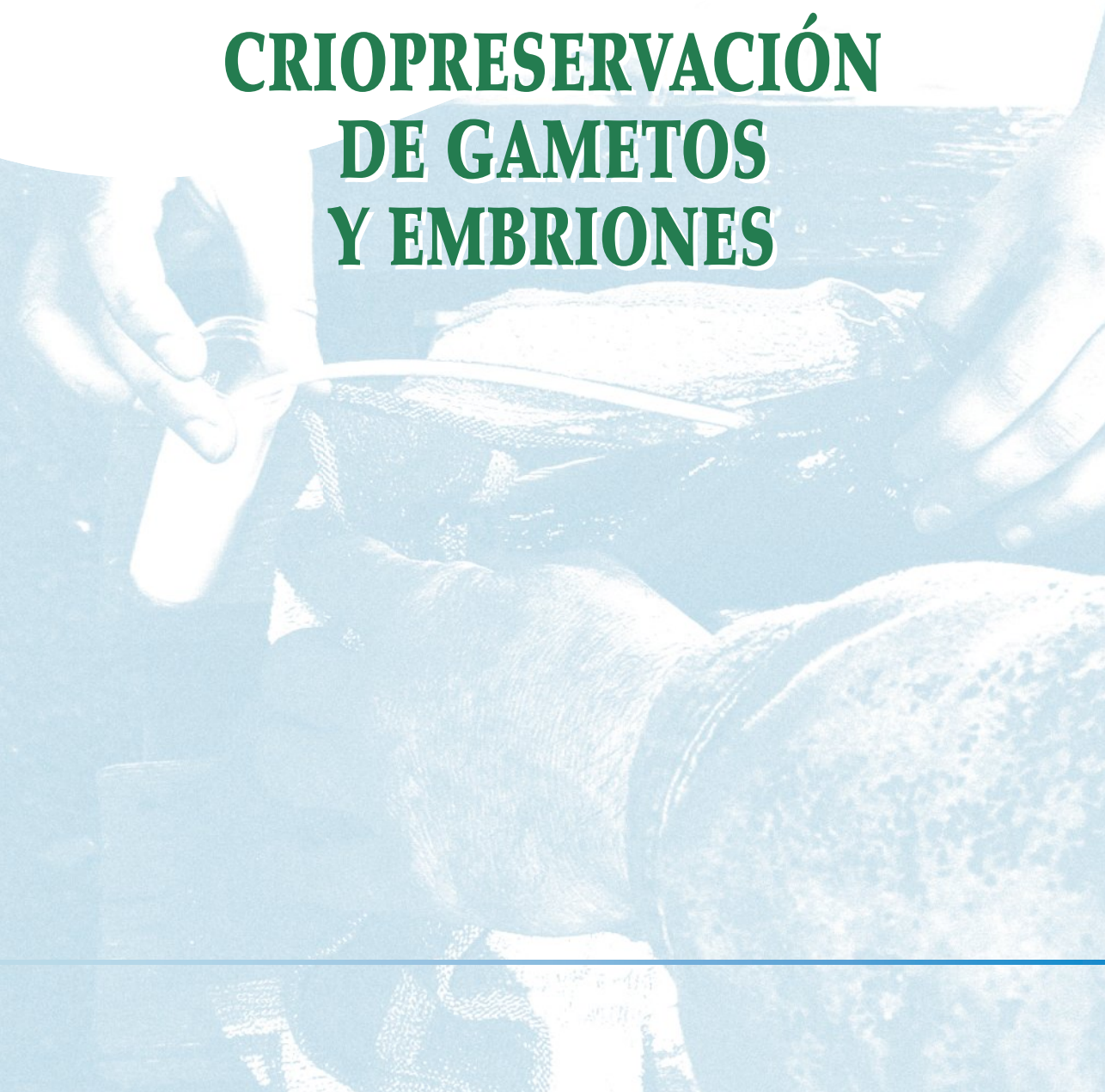
- WANG, J., y X. J. LIU, 2004. Progesterone inhibits protein kinase A (PKA) in *Xenopus* oocytes: demonstration of endogenous PKA activities using an expressed substrate. *J. Cell Sci.* 117: 5107-5116.
- WATANABE, W. O., y C.-M. KUO, 1986. Water and ion balance in hydrating oocytes of the grey mullet, *Mugil cephalus* (L.), during hormone-induced final maturation. *J. Fish Biol.* 28: 425-437.
- WEBER, G. M., y C. V. SULLIVAN, 2000. Effects of insulin-like growth factor-I on in vitro final oocyte maturation and ovarian steroidogenesis in striped bass, *Morone saxatilis*. *Biol. Reprod.* 63: 1049-1057.
- WEBER, G. M., y C. V. SULLIVAN, 2001. In vitro hormone induction of final oocyte maturation in striped bass (*Morone saxatilis*) follicles is inhibited by blockers of phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 129: 467-473.
- WEBER, G. M., y C. V. SULLIVAN, 2005. Insulin-like growth factor-I induces oocyte maturational competence but not meiotic resumption in white bass (*Morone chrysops*) follicles in vitro: evidence for rapid evolution of insulin-like growth factor action. *Biol. Reprod.* 72: 1177-1186.
- WRIGHT, P. A., y H. J. FYHN, 2001. Ontogeny of nitrogen metabolism and excretion, pp 141-201. En: *Nitrogen Excretion. Fish Physiology*, Vol 20, editado por P. A. Wright y P. M. Anderson. Academic Press, San Diego.
- XIE, J., J. J. WEN, Z. A. YANG, H. Y. WANG y J. F. GUI, 2003. Cyclin A2 is differentially expressed during oocyte maturation between gynogenetic silver crucian carp and gonochoristic color crucian carp. *J. Exp. Zool.* 295A: 1-16.
- YAKATA, K., Y. HIROAKI, K. ISHIBASHI, E. SOHARA, S. SASAKI, K. MITSUOKA y Y. FUJIYOSHI, 2007. Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochim Biophys Acta.* 1768: 688-693.
- YAMAGUCHI, A., M. YAMASHITA, M. YOSHIKUNI y Y. NAGAHAMA, 2001. Identification and molecular cloning of germinal vesicle lamin B3 in goldfish (*Carassius auratus*) oocytes. *Eur. J. Biochem.* 268: 932-939.
- YAMAHAMA, Y., N. UTO, S. TAMOTSU, T. MIYATA, Y. YAMAMOTO, S. WATABE y Y. TAKAHASHI, 2003. In vivo activation of pro-form *Bombyx* cysteine protease (BCP) in silkworm eggs: localization of yolk proteins and BCP, and acidification of yolk granules. *J. Insect Physiol.* 49: 131-140.
- YAMASHITA, M., S. FUKADA, P. BULET, T. HIRAI, A. YAMAGUCHI, Y. H. LOU, Z. ZHAO y Y. NAGAHAMA, 1992a. Purification and characterization of maturation-promoting factor in fish. *Dev. Biol.* 149: 8-15.
- YAMASHITA, M., S. FUKADA, M. YOSHIKUNI, P. BULET, T. HIRAI, A. YAMAGUCHI, H. YASUDA, Y. OHBA, y Y. NAGAHAMA, 1992b. M-phase-specific histone H1 kinase in fish



- oocytes. Purification, components and biochemical properties. Eur. J. Biochem. 205: 537-543.
- YAMAMOTO, K., y F. YAMAZAKI, 1961. Rhythm of development in the oocyte of the goldfish, *Caraussius auratus*. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. 12: 93-110.
- YARON Z, G. GUR, P. MELAMED, H. ROSENFELD, A. ELIZUR y B. LEVAVI-SIVAN, 2003. Regulation of fish gonadotropins. Int. Rev. Cytol. 225: 131-185.
- YOSHIKUNI, M., y Y. NAGAHAMA, 1994. Involvement of an inhibitory G-protein in the signal transduction pathway of maturation-inducing hormone (17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one) action in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) oocytes. Dev. Biol. 166: 615-622.
- YOSHIKAZI, G., R. PATIÑO, P. THOMAS, D. BOLAMBA, y X. CHANG, 2001. Effects of maturation-inducing hormone on heterologous gap junctional coupling in ovarian follicles of Atlantic croaker. Gen. Comp. Endocrinol. 124: 359-366.
- YOUNG, G., H. KAGAWA y Y. NAGAHAMA, 1983. Evidence for a decrease in aromatase activity in the ovarian granulosa cells of amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) associated with final oocyte maturation. Biol. Reprod. 29: 310-315
- YOUNG, G., S. ADACHI y Y. NAGAHAMA, 1986. Role of ovarian thecal and granulosa layers in gonadotropin-induced synthesis of a salmonid maturation-inducing substance (17α , 20β -dihydroxy-4-pregnen-3-one). Dev. Biol. 118: 1-8.
- ZHANG, T., D. M. RAWSON, I. PEKARSKY, I. BLAIS, y E. LUBZENS, 2007. Low-temperature preservation of fish gonad cells and oocytes, pp 411-436. En The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications, edited by P. J. Babin, J. Cerdà and E. Lubzens. Springer, The Netherlands.
- ZHU, Y., C. D. RICE, Y. PANG, M. PACE y P. THOMAS, 2003a. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 2231-2236.
- ZHU, Y., J. BOND y P. THOMAS, 2003b. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 2237-2242.

7

CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS Y EMBRIONES





CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS Y EMBRIONES

M.^a Paz Herráez

Departamento de Biología Molecular,
Universidad de León

Resumen

La conservación de germoplasma es una herramienta básica que tiene aplicación en el manejo de la reproducción, ya sea con fines productivos, de conservación de la biodiversidad o de mantenimiento de variedades de especial valor biotecnológico. En el caso de los peces son de interés los tres aspectos, teniendo en cuenta el desarrollo de los programas de selección en acuicultura, la situación de determinadas variedades ictícolas debido a problemas ambientales y la existencia de cepas de gran valor biotecnológico que han de ser mantenidos en cultivo.

La congelación seminal de peces no plantea graves problemas, habiéndose desarrollado tanto técnicas que permiten su uso rutinario en aquellas especies en las que puede resultar práctico o el establecimiento de bancos útiles para los planes de mejora genética, como tecnologías que hacen posible recuperar poblaciones tan sólo a partir de espermatozoides congelados. La congelación de ovocitos y embriones no ha sido lograda hasta el momento, ya que presentan especiales dificultades. Este capítulo plantea los fundamentos de la criopreservación celular y sus aplicaciones a la reproducción de peces. En él se resumen protocolos de congelación seminal y se explican los avances conseguidos en la congelación de embriones, ovocitos y blastómeros. Estos últimos, junto con otras células somáticas, representan una importante fuente de germoplasma para futuras aplicaciones en tecnología de la reproducción.



Abstract

Germplasm preservation is a basic tool for selection programs as well as for management of biodiversity conservation and for protection of biotechnological valuable strains. All these applications are interesting for teleosts, taken into account the efforts that are being made in selection programs for aquaculture, the threat for extinction of some species and strains and the interest from the biotechnological point of view, of the preservation of specific strains.

Fish sperm freezing provides satisfactory results, and methods have been developed to allow the use of cryopreserved sperm as a routine handling procedure in some species, or to create sperm banks for valuable breeders. Technologies to recover endangered populations from frozen sperm have also been developed. On the other hand, cryopreservation of oocytes and embryos remains still elusive. This chapter displays the basic principles of cell cryopreservation and their applications to fish reproduction. It summarizes some protocols used for sperm freezing in different species and the recent progress on embryo, oocyte and blastomere cryopreservation.

7.1. LA CRIOBIOLOGÍA EN EL CONTEXTO DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

La criobiología es la ciencia que trata de conseguir la conservación de la vida a bajas temperaturas. La posibilidad de suspender la actividad celular durante un tiempo indefinido y lograr una posterior «reanimación», se presenta como una útil e importante herramienta para la ciencia en general y para la biología de la reproducción en particular. Se basa en el hecho de que al reducir la temperatura se frenan o ralentizan todos los procesos biológicos. Para garantizar que no exista ningún tipo de actividad metabólica, así como procesos de autólisis o putrefacción, la reducción de la temperatura ha de ser muy acusada, de forma que las muestras biológicas sólo se verán influidas por el efecto de las radiaciones ionizantes, que teóricamente sería significativo en un plazo de cientos o miles de años. Se define, por tanto, como criopreservación la conservación de muestras biológicas (células, tejidos u órganos) a una temperatura inferior a $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Mazur, 1984), lo que permite su conservación prácticamente indefinida.



Históricamente la criopreservación ha estado ligada a la congelación de semen. Ya en el siglo XVIII, Spallanzani observó que al exponer espermatozoides de semen humano y de caballo a temperaturas bajo cero, se inhibía su motilidad de forma reversible (Spallanzani, 1776). Desde mediados del siglo XIX comenzó la experimentación en el campo de la congelación de espermatozoides, en principio más sencilla de realizar que la de otros tejidos o sistemas complejos. Un avance muy significativo fue realizado por Polge y su equipo a mediados del siglo XX (Polge *et al.* 1949), al descubrir las cualidades crioprotectoras del glicerol añadido al plasma seminal. También la generalización del uso del nitrógeno líquido (a una temperatura de -196°C) en sustitución de la nieve carbónica (-79°C) a partir de la década de los 50, impulsó mucho el desarrollo de esta ciencia.

Pronto se vieron las aplicaciones que podría tener su utilización en el control de la reproducción y, dado el enorme interés económico de las industrias ganaderas y de la medicina reproductiva, en las últimas décadas se ha potenciado muchísimo, tanto el trabajo en criopreservación de gametos y embriones, como el desarrollo de tecnologías paralelas en el campo de la reproducción asistida. Además de utilizarse en el campo reproductivo, la criobiología se aplica a la conservación de diferentes tipos celulares y tejidos para su posterior utilización médica (médula ósea, células stem, células sanguíneas, hueso, condrocitos, tendones, córneas, hepatocitos, piel, válvulas cardíacas, arterias, islotes de Langerhans, tráquea, uretra, etc). Sin embargo, la conservación de órganos resulta mucho más problemática y aun no ha sido lograda con éxito.

Los avances realizados en el campo de la conservación de gametos (espermatozoides y ovocitos) y embriones no humanos han sido revisados por numerosos autores (Watson y Fuller, 2001; Leibo y Songsasen, 2002; Vajta y Kuwayama, 2006) y se aplican actualmente en dos campos principales, la producción animal y la conservación de recursos genéticos.

Por lo que respecta a la producción animal, la congelación de semen se ha intentado en todas las especies animales con interés ganadero, pero el éxito obtenido ha sido variable. En ganado bovino la fecundación artificial con semen congelado es actualmente el método más utilizado en la producción de ganado lechero y va ganando posiciones en la pro-



ducción de terneros de carne. Las ventajas son enormes, tanto desde el punto de vista económico, como –especialmente– desde el punto de vista de la selección y mejora animal (utilización de sementales selectos), de forma que se ha creado una industria de proporciones crecientes en torno a la producción de dosis seminales (Funk, 2006). La exportación de esperma congelado de ganado bovino de las industrias norteamericanas alcanzó en 2005 los 2.210.000\$. En ganado ovino, porcino y equino aun no se aplica como técnica rutinaria de inseminación, aunque el mercado del semen congelado de sementales selectos representa cientos de millones de euros al año. También son numerosos los trabajos realizados con carnívoros domésticos, especialmente gatos, y en segundo lugar perros, fundamentalmente de cara a la selección de razas y la conservación del genoma de animales de gran valor.

En general se observa que la calidad del semen congelado y posteriormente descongelado se reduce significativamente, por lo que su utilización requiere métodos de inseminación adecuados. De esa forma, seleccionado los mejores espermatozoides o inseminando con mayores dosis de semen o mas cerca del lugar de fecundación, se pueden obtener resultados cada vez mas satisfactorios. En cualquier caso, la pérdida de viabilidad o funcionalidad de los espermatozoides de mamíferos tiene una importancia relativa, ya que, dependiendo de la técnica de reproducción asistida que se vaya a emplear, el número de espermatozoides puede verse enormemente reducido.

En mamíferos de laboratorio también se realizan un gran número de investigaciones, principalmente con el fin de conseguir la conservación de líneas animales que resultan interesantes como modelos de estudio de enfermedades humanas o de análisis de procesos biológicos. La criopreservación de semen de ratón se ha conseguido desde 1990, aunque los resultados no han sido siempre reproducibles. Igualmente se han hecho avances en la congelación de semen de aves domésticas (Bellagamba et al 1993).

En el campo de la conservación de especies amenazadas, la creación de bancos de esperma es una herramienta cada vez mas apreciada, ya que reduce significativamente el número de animales vivos necesarios para mantener una población viable (Roldán y Garde, 2004). Los avances en este campo son mas lentos, debido a que hay menos co-



nocimientos sobre la fisiología reproductiva de las especies en cuestión y a la dificultad para la obtención de muestras y la realización de protocolos experimentales. No obstante, el ritmo de creación de bancos de recursos genéticos (GRB) –fundamentalmente esperma– de especies amenazadas, se ha incrementado de forma intensa en los últimos años, y se están llevando a cabo programas dirigidos a la conservación de ungulados, felinos o grandes mamíferos en diferentes partes del mundo (Watson y Holt, 2001).

La conservación de ovocitos presenta muchas más dificultades técnicas que la del esperma. Esto es debido a las características de estas células, que por su tamaño, su contenido en lípidos, la disposición de su material genético y de su citoesqueleto, sufren una gran cantidad de daños durante la criopreservación. No obstante, se ha logrado la fertilización de ovocitos congelados/descongelados en ratón, hamster, conejo, vaca y humano entre otras especies (Watson y Fuller, 2001). El avance en este campo va mas ligado a la medicina reproductiva en humanos y al desarrollo de progenies clónicas u otras técnicas de manipulación genética, que a su aplicación directa en ganadería.

El caso de los embriones presenta una dificultad intermedia. En la década de los 70 se criopreservaron con éxito embriones de ratón (Whittingham *et al.* 1972) y se publicó el primer caso de preñez con embriones congelados bovinos (Wilmut y Rowson, 1973). Hasta la fecha se han desarrollado tecnologías para la congelación de embriones de ganado vacuno, de oveja, caballo, gato, conejo, mandril, tití, ratón, rata, mono (Rall, 1992) y humano (Trousens y Mohr, 1983) y, más recientemente, en el año 2000, se obtuvieron los primeros cerdos nacidos de embriones congelados. Las tasas de embarazo y supervivencia hasta el parto obtenidas tras la transferencia de los embriones descongelados a una hembra receptora, aún no son semejantes a las que se obtienen con embriones frescos, pero se espera que en un futuro no muy lejano el uso de embriones congelados se generalice en algunas especies.

7.1.1. La criobiología en el contexto de la acuicultura

La acuicultura industrial puede considerarse una actividad reciente en relación a otras producciones animales, pero es, probablemente la que ha sufrido un mayor avance tecnológico en las últimas décadas.



De igual forma, la congelación de espermatozoides de teleósteos no se consiguió hasta 1953 (Blaxter, 1953) y su avance fue lento, debido a que durante décadas se realizó una transferencia directa de las técnicas usadas en mamíferos, sin apenas conocimiento de los fundamentos criobiológicos y la particular fisiología de los gametos y embriones de peces. En los últimos años el ritmo de desarrollo de métodos de conservación a largo plazo de semen se ha incrementado notablemente, de forma que ya en 1995 se calculaba que se había estudiado la congelación de espermatozoides de más de 200 especies acuáticas (Rana, 1995). Sin embargo la criopreservación de ovocitos y embriones sigue representando un desafío para los criobiólogos, que aun no han conseguido la supervivencia de los mismos tras la congelación.

La conservación a bajas temperaturas de semen o embriones de peces puede presentar grandes beneficios para la acuicultura, que han sido descritos en la literatura en las últimas décadas (Scott y Baynes, 1980; Stoss y Holtz, 1983; Rana, 1995; Chao y Liao, 2001; Billard y Zhang, 2001) y sus aplicaciones incluyen desde el manejo del espermatozoide congelado como rutina en la producción de determinadas especies, a la puesta en marcha de estrategias particulares en otras especies con problemas de reproducción en cautividad, la creación de bancos de genes que hagan posible desarrollar programas de selección o la conservación de células de especies o variedades en peligro de extinción, para permitir la posterior recuperación de la población amenazada.

La congelación seminal se ha implantado con mayor rapidez en las plantas de producción de especies que requieren fecundación artificial, como los salmónidos o el rodaballo. En ellas, la necesidad de la obtención de espermatozoides y la práctica en su manejo ha hecho ver rápidamente a los productores las ventajas que representa poder disponer de un almacén permanente de semen de calidad contrastada. No obstante, el cultivo de otras especies como la dorada, en las que normalmente se produce fecundación natural en los tanques de reproductores, también puede verse muy beneficiado por el uso de ésta tecnología. Uno de los campos a los que se está dedicando más atención últimamente es la identificación genética de los stocks, con el fin de mantener una adecuada variabilidad y realizar programas de selección genética. En este campo, la creación de bancos de espermatozoides es una herramienta



indispensable. Por otra parte, según el libro blanco de la acuicultura en España, «las estirpes salvajes que se están cultivando en la actualidad son importantes y hay que conservarlas como banco genético en el futuro», siendo la forma mas adecuada la creación de criobancos.

La criopreservación de gametos y embriones de peces puede permitir:

1. La organización del trabajo de extracción de gametos y fertilización de una forma más cómoda en aquellas especies que requieren fecundación artificial, como el rodaballo o la trucha. La necesidad de chequear el estado de machos y hembras y de realizar la fecundación inmediatamente después puede resultar laboriosa y, en muchas ocasiones, la cantidad de semen y ovocitos obtenidos no mantiene la proporción adecuada, obligando a desperdiciar parte del material obtenido. Habitualmente, la extracción del semen puede realizarse en un margen de tiempo más amplio, por lo que se puede programar su obtención y congelación asegurando su disponibilidad cuando las hembras alcancen el momento óptimo.

2. El transporte de semen o embriones criopreservados entre piscifactorías, evitando el traslado de reproductores o huevos fecundados, que, además de ser costoso, acarrea problemas tales como la transmisión de enfermedades, dificultades de circulación de animales entre países, etc. El semen y los embriones congelados representan así un nuevo producto a comercializar, cuyo valor puede llegar a ser muy importante.

3. La racionalización de la programación de la reproducción, permitiendo obtener los gametos en la época reproductora para su utilización a lo largo del año. Actualmente, mediante los diferentes métodos de control de la reproducción existe la posibilidad de alterar o alargar el periodo reproductor de la especie. Sin embargo, estas alteraciones no siempre son eficaces y presentan un estrés para los animales. Además, pueden representar un gran coste en instalaciones y acarrear problemas de mantenimiento de los reproductores maduros en determinadas épocas del año. Por otra parte, las puestas inducidas fuera de la época reproductora no siempre son de igual calidad a las obtenidas en la época natural.

4. El aumento de la eficacia reproductora debido a la eliminación de individuos poco aptos y al aprovechamiento de todos los gametos en el



momento óptimo de maduración, bien para su utilización en fresco o para su congelación y posterior uso en el momento adecuado. A través de la comercialización de semen se podría además reducir el número de reproductores, ya que siempre se podría recurrir a la compra de dosis seminales.

5. La programación de los cruces de interés, ya que el semen estaría siempre disponible, y además se podrían congelar embriones resultantes de cruces deseados. Este punto es muy interesante en especies con una corta vida fértil que hace imposible la programación de la prole, como los salmones, que mueren tras liberar el esperma, obligando a cruzar entre sí aquellos individuos cuyo momento de madurez coincide, sin poder aplicar otros criterios. En el caso del pez gato europeo, los salmónidos hembras a los que se aplica la reversión sexual para su transformación en machos funcionales y otras especies, la dificultad en obtener semen lleva al sacrificio de los animales para extraer sus testículos, lo que limita la utilización del esperma al momento del sacrificio. En las especies con hermafroditismo protándrico, como la dorada, los individuos son machos el primer año y posteriormente se transforman en hembras, por lo que resulta imposible cruzar entre sí individuos de la misma generación y el número de machos no está asegurado en el segundo año (Chambeyron y Zohar, 1990). Por otra parte, en aquellos casos en que se desee recurrir a la introducción de genes salvajes en la población en cultivo, con el fin de aumentar el vigor híbrido, la disponibilidad de gametos congelados reduciría los problemas asociados a la realización de dichos cruzamientos.

6. La posibilidad de aprovechar al máximo el material reproductor de cada individuo es especialmente clara en especies con características reproductoras particulares. En algunos peces como el mero o el esturión, los machos maduran sexualmente con dimensiones bastante grandes y avanzada edad, y el potencial reproductor del pequeño número de machos que se puede mantener en cautividad no es totalmente aprovechado.

7. En algunas especies cultivadas la maduración de machos y hembras no ocurre de forma simultánea, haciendo preciso la inducción y sincronización de la puesta, con los consiguientes costos de programación y el estrés asociado para los animales, que podrían ser evitados si se dispone de criobancos seminales.



8. La congelación de los gametos permitiría también la programación de cruces para la obtención de híbridos, muy interesantes para la acuicultura, pero que, en ocasiones, no pueden realizarse por los diferentes periodos reproductores de las especies parentales.

9. La creación de bancos de recursos genéticos (GRB). Como hemos mencionado, en muchas plantas de producción se está realizando la caracterización genética de los stocks con el fin de realizar programas de mejora y selección. Para llevar a cabo estos programas es indispensable disponer de una técnica que permita conservar el genoma de aquellos individuos considerados de interés. Los individuos seleccionados no pueden ser mantenidos en cultivo y producción ya que están expuestos al riesgo de muerte accidental o por enfermedad, así como a la deriva génica que se produce con el paso de generaciones. Así, por ejemplo, Ostergaard et al (2003) han demostrado que en trucha la diferenciación entre poblaciones que produce la deriva génica debido al paso de generaciones (el factor temporal) es incluso superior a la producida por la localización de los animales en diferentes cursos fluviales (el factor espacial). Por otra parte, Riabova et al (2006) han demostrado que en los cultivos de esturión se produce una pérdida de variabilidad genética a lo largo del tiempo que está relacionada con la densidad del cultivo, de forma que los cultivos intensivos reducen dicha variabilidad. Sin embargo, el mantenimiento de células congeladas (espermatozoides, células embrionarias o, como veremos mas adelante, otros tipos celulares), no conlleva pérdida de variabilidad genética a lo largo del tiempo, por lo que es un método mucho mas cómodo, barato y seguro de mantener el genoma de un individuo o de una población.

No obstante, la criopreservación no aporta solamente beneficios a la acuicultura industrial sino a un vasto campo que abarca la producción de peces ornamentales, el cultivo de especies de interés científico o biotecnológico como el pez cebra o la conservación de especies o variedades locales en peligro de extinción.

Desde el punto de vista de la conservación de la biodiversidad, esta técnica permite guardar el genoma de poblaciones salvajes amenazadas fuera del medio natural. Estas «poblaciones congeladas» sirven como stock genético durante el tiempo necesario para reformar los



hábitats (Rall, 1993; Hagedorn y Kleinhans, 2000). También permite recuperar variedades genéticas perdidas por la escasez de individuos en un determinado punto (tramo de río aislado, lago, etc.) o por desastres ecológicos, enfermedades, etc. Según la IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources), actualmente se consideran en peligro de extinción 1571 especies de peces. La mayoría de ellas corren peligro debido a la degradación de su hábitat por efecto de actividades humanas (entre ellas algunos esturiones, anguilas o tiburones) y al menos 43 por sobrepesca. Otra causa de riesgo para algunas poblaciones son las introducciones de especies exóticas, ahora más vigiladas, pero que se han permitido hace años y han tenido importantes consecuencias, especialmente entre las especies de agua dulce. Muchas de las especies o variedades en peligro, especialmente estas últimas, tienen un gran valor económico para las áreas de donde son originarias y representan un recurso alimentario de primera necesidad, como por ejemplo algunos peces amazónicos que han visto descender sus poblaciones de forma alarmante en las últimas décadas. Otro ejemplo es el siluro gigante del Mekong (*Pangasianodon gigas*), que puede llegar a los 300 Kg. Es un pez migratorio que en época de puesta remonta el río para desovar en un área relativamente pequeña. Esa subida es aprovechada para la pesca en Camboya y Laos, pero desde el año 2000 las capturas se han reducido alarmantemente, debido a las alteraciones producidas en el río por las explotaciones forestales (cambios de curso, eliminación de rápidos, etc), de forma que algunos años no se han pescado mas de 4 o 5 ejemplares (en 2005 se capturó un ejemplar de 293 Kg, al cual se le extrajeron los testículos para la conservación del esperma). Actualmente se han iniciado planes de seguimiento y se está intentando la cría en cautividad, que se ve muy favorecida por los aportes de esperma de estas capturas de grandes animales maduros. Otras especies emblemáticas son los esturiones, cuyas poblaciones descienden de forma alarmante y cuyo valor económico es muy elevado. En este sentido se están haciendo muchos esfuerzos para conservar las poblaciones de diferentes especies a partir de semen congelado (Grunina *et al.* 2006). Son también numerosos los trabajos dedicados a la conservación de poblaciones o subespecies de salmónidos y ciprínidos utilizando como herramienta la congelación esper-



mática para, posteriormente, fecundar ovocitos de especies próximas mediante procesos de androgénesis (Grunina *et al.*, 2006).

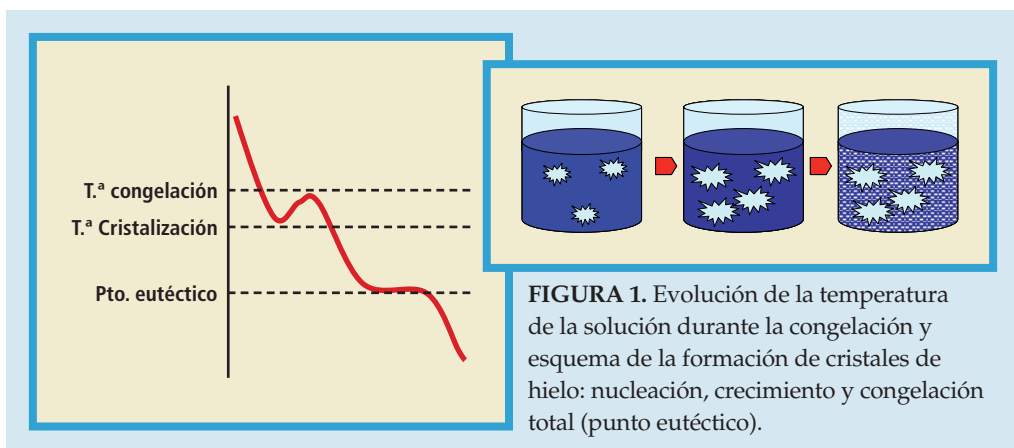
En las conclusiones de la Conferencia de Naciones Unidas sobre Medio Ambiente y Desarrollo, celebrada en 1992, ya se propuso la creación de un banco internacional de recursos genéticos de peces, para preservar el genoma de las especies en peligro de extinción mediante la congelación de su esperma. Este banco se inició en Vancouver en 1994 bajo la dirección del Dr Harvey (Internacional Fisheries Gene Bank: www.worldfish.org/wft_experience.pdf).

Por otra parte no debemos olvidar la utilidad de los bancos de gametos o embriones, no ya desde el punto de vista productivo, sino desde el punto de vista de la investigación (conservación de modelos animales como por ejemplo líneas específicas de pez cebra o medaka, o conservación de poliploides, transgénicos o cepas empleadas para estudios ecotoxicológicos) (Hagedorn *et al.*, 1998; Billard y Zhang, 2001).

7.2. PRINCIPIOS BÁSICOS DE CRIOBIOLOGÍA

7.2.1. Procesos físico-químicos asociados con la congelación de muestras biológicas

Como se observa en la Figura 1, cuando una solución acuosa cualquiera se enfría por debajo de su punto de congelación debería producirse la formación de cristales de hielo. Este fenómeno se desencadena normalmente a una temperatura inferior (la solución permanece, por tanto, sobreenfriada), ya que requiere la presencia de pequeñas partículas, la formación de ondas en la solución o la aplicación de una presión momentánea, que favorezca la creación del núcleo de los cristales. Una vez iniciada la nucleación, el agua va cristalizando a su alrededor, aumentando el tamaño o el número de cristales de hielo a medida que la temperatura desciende. Los cristales están compuestos solo por agua, de modo que la solución que permanece sin congelar aumenta su concentración progresivamente. Se calcula que a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ la fracción no congelada tiene una concentración 20 veces superior a la original.



Finalmente, se alcanzará un punto en que el resto de la solución se solidifica al alcanzar su temperatura de congelación (punto eutéctico).

Como hemos mencionado, la congelación de muestras biológicas ha de hacerse por debajo de $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. El modo mas adecuado de conseguir esa temperatura es utilizar nitrógeno líquido (N_2L), que se mantiene a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ y proporciona un medio muy apropiado para la criopreservación.

Si lo que se intenta es congelar una suspensión de células mantenidas en una solución lo que ocurre es lo siguiente (Fig. 2): debido a la estructura y composición celular, el punto de congelación de la solución es más elevado que el del interior de la célula. Por eso, al ir descendiendo la temperatura comienza la formación de cristales de hielo en el exterior, con el consiguiente aumento de concentración de la fracción no congelada. Dada la capacidad de las células de equilibrar su concentración con la del medio que las rodea (osmorregulación), éstas van perdiendo agua y reduciendo su volumen. Cuando la temperatura sea muy reducida, tanto el exterior como el interior celular quedarán congelados. El proceso sucederá de forma diferente dependiendo de la velocidad de enfriamiento:

- Si la congelación es rápida la formación de cristales comienza en el exterior, pero la temperatura de congelación interior se alcanza antes de que la célula haya tenido tiempo de deshidratarse por completo.



Por ello también se formarán cristales de hielo dentro de la célula, causando la rotura de sus estructuras y la muerte.

- Cuando la congelación es lenta el crecimiento de los cristales de hielo también lo es. Las células van perdiendo agua poco a poco, reduciendo cada vez más su punto de congelación, que se alcanzará cuando la célula esté prácticamente deshidratada. Las células reducirán su volumen y quedarán incluidas en estrechos canales entre los cristales exteriores. Además, durante un largo tiempo quedarán expuestas a una solución cada vez mas concentrada, que puede causar serios daños (el denominado efecto solución), debido a alteraciones del pH del medio, estrés osmótico, desnaturalización de enzimas, etc.

Cuando la muestra a congelar aumenta de tamaño, o consiste en un conjunto de células agrupadas de forma más compleja, el flujo de agua a través del sistema y el intercambio con el exterior son más lentos, produciéndose diferencias entre las células exteriores e interiores. Por ello la dificultad estriba en provocar un enfriamiento y una deshidratación lo mas homogénea posible.

Una vez congeladas las células a la temperatura del N_2 l los movimientos de todas las partículas están inhibidos, por lo que no ocurren cambios en las muestras ya congeladas. Sin embargo, durante la descongelación y a partir de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, empieza a aumentar la movilidad de las moléculas de agua. Si esta fase de la descongelación se produce de forma lenta, se puede provocar un crecimiento de los cristales de hielo que se habían formado durante la congelación, al asociarse a ellos nuevas moléculas de agua (igual que ocurre alrededor de los alimentos congelados al ser extraídos de un congelador) (Fig. 2). Si eso sucede en el interior celular causaría graves daños mecánicos a las células. Por eso la descongelación debe ser, generalmente, rápida.

7.2.2. Crioprotectores

Teniendo en cuenta los fenómenos que ocurren durante la congelación, la criopreservación celular no sería posible, independientemente de la velocidad de congelación. Los daños producidos por una u otra causa harían inviables todas las células por debajo de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Determinadas sustancias, añadidas a la solución, son capaces de ejercer efectos crioprotectores, permitiendo realizar el proceso. Existen una gran

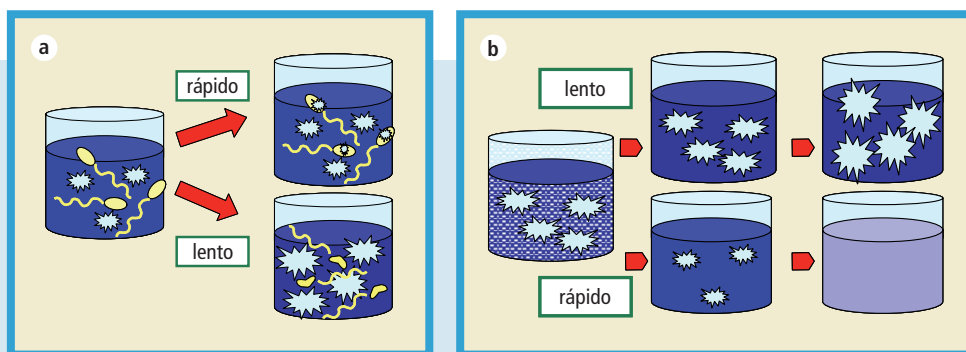


FIGURA 2.

a) Esquema del proceso de congelación de una solución de espermatozoides
y b) inicio de la descongelación, a dos velocidades.

variedad de crioprotectores (CPTs) que ejercen su acción de forma diferente. En muchos casos el mecanismo de acción es desconocido, pero en la mayoría estas sustancias disminuyen la formación de cristales de hielo, de forma que, a una temperatura dada, la formación de cristales es más reducida y, por tanto, la deshidratación de la célula es menor y también lo es el efecto solución. Además, a temperaturas más bajas la célula es menos sensible a esos efectos. Al alcanzar el punto eutéctico no ha habido una cristalización tan importante ni un efecto solución tan acusado.

Algunos agentes penetran en las células, actuando como protectores a ambos lados de la membrana. Entre estos CPTs permeables están el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), metanol, propanodiol o etilenglicol. Su entrada en la célula produce la salida de agua intracelular y disminuye la temperatura de nucleación del hielo, evitando que se formen cristales en el interior antes de que la célula esté deshidratada. Además, interaccionan con la membrana plasmática, evitando algunos de los cambios que se producen en esta estructura durante la congelación. Sin embargo, estos agentes también pueden resultar tóxicos para las células, produciendo por sí mismos daños celulares de gran importancia. Su toxicidad depende en gran medida de la concentración, pero también de la temperatura a la que se utiliza y del tiempo de contacto con las células. La elección de un CPT depende del tipo



celular a congelar y de la especie en cuestión. Así, por ejemplo, el glicerol es adecuado para el semen de muchas especies de mamíferos y también para algunas especies de peces. Sin embargo en la mayoría de los peces resulta mucho más beneficioso el DMSO.

Existen también sustancias de elevado peso molecular, incapaces de penetrar en las células, que ejercen su acción crioprotectora desde el exterior. Normalmente actúan provocando una deshidratación de las células y aumentando la viscosidad de la solución exterior. Estos efectos permiten reducir la formación de hielo y también disminuir la concentración de CPTs permeables necesarios, reduciendo sus efectos tóxicos. Entre ellos están algunas sustancias sintéticas como la polivinilpirrolidona (PVP), el Ficoll, los polivinilalcoholes (PVA), el X1000® o distintos azúcares como la sacarosa o la fructosa, cada vez más utilizados por su escasa toxicidad.

Otros agentes que se utilizan para minimizar los riesgos de la criopreservación celular son sustancias sin efecto sobre el proceso de la congelación, pero que ejercen una protección específica sobre la membrana plasmática, que es probablemente la estructura más sensible. Algunos son de naturaleza lipídica (o lipoproteica) como la yema de huevo, muy empleada en criobiología (existen extractos comerciales libres de patógenos), otros son extractos fundamentalmente proteicos, como la leche en polvo, la BSA (albúmina de suero bovina) o los extractos proteicos de soja. Dentro de este capítulo merecen mención aparte las proteínas anti-congelación (AFPs), aisladas de organismos marinos del Ártico, que son capaces de sobrevivir a temperaturas inferiores a 0 °C. Estas proteínas parecen proporcionar un alto grado de crioprotección sin apenas efectos tóxicos, pero aun están en fase experimental.

7.2.3. Alteraciones celulares producidas por la criopreservación

La criopreservación puede dañar a las células por varios factores:

1. La refrigeración o «choque frío» (cold shock) puede causar daños durante el enfriamiento y sobreenfriamiento de las células.
2. La congelación en sí, produce cristales de hielo y causa estrés osmótico por las variaciones en la concentración del medio externo.

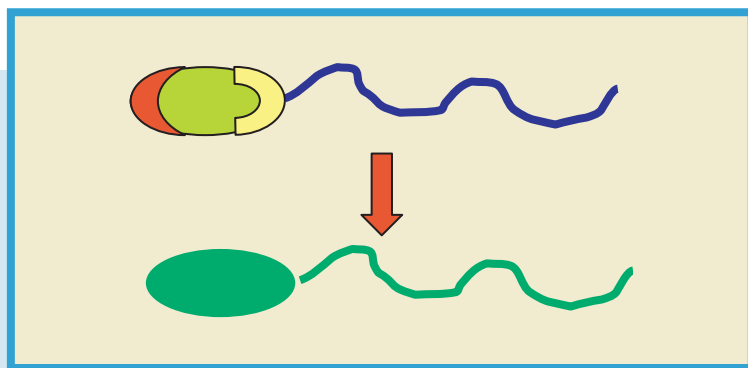


3. La toxicidad de los crioprotectores afecta a distintas funciones.

El efecto de la refrigeración depende de la sensibilidad de cada tipo de célula al choque frío. Así por ejemplo el semen y los embriones de mamíferos mantienen una temperatura comprendida entre los 30 y 40 °C y el descenso hasta 4 °C puede representar una alteración muy importante. En el caso de los peces, y especialmente los de agua fría, la refrigeración hasta estas temperaturas no suele provocar daños reseñables. Sin embargo, el descenso hasta -15 ó -20 °C puede ser crucial. La estructura más dañada es la membrana plasmática, que puede perder la disposición de sus lípidos formando una bicapa. Cuando los lípidos que la componen alcanzan su punto de transición, la membrana puede desorganizarse, empaquetándose para formar pequeñas micelas. De esta forma se pierde la organización típica del mosaico fluido de membrana, afectando a la permeabilidad y otras funciones celulares. Los lípidos se desorganizan y las proteínas que hay entre ellos formando canales de permeabilidad o moléculas de reconocimiento, se ven afectadas. Además, en condiciones normales las membranas que rodean las células no son homogéneas. La superficie celular tiene regiones o dominios diferentes con funciones específicas (algo muy acusado en el caso de los espermatozoides). La pérdida del mosaico fluido durante la congelación hace que, en muchos casos, esa regionalización se pierda (Fig. 3), afectando a la capacidad de realizar funciones vitales, como la recepción y envío de señales que inicien la motilidad, o el reconocimiento de la membrana del huevo para fusionarse con ella y realizar la fecundación.

El descenso de la temperatura también afecta a los componentes del citoesqueleto, especialmente a los filamentos que hay bajo la membrana y que ayudan a mantener la forma de la célula y la regionalización de la misma. Su desorganización contribuye también de forma decisiva a los cambios en la permeabilidad de la célula y la activación de la motilidad.

Por otra parte, durante el enfriamiento se produce un exceso de radicales libres, que tienen efectos nocivos sobre las membranas y otros lípidos celulares así como sobre la estructura de la cromatina, lo que produce una reducción de la viabilidad celular, y un deterioro del ma-

**FIGURA. 3.**

Esquema de las diferentes regiones o dominios de membrana espermática y homogeneización provocada por el enfriamiento.

terial genético. La conservación de células a bajas temperaturas previa a la congelación, puede hacer que estos radicales dañen seriamente las células.

Los daños provocados por el «cold shock» se pueden reducir utilizando protectores de la membrana que se asocian a sus componentes y reducen las alteraciones de los lípidos y la redistribución de las proteínas en la superficie, así como agentes antioxidantes, como el ácido cítrico, que evitan los daños oxidativos.

La congelación/descongelación es una fase crítica. Como hemos mencionado, la formación de cristales dentro de la célula debe evitarse por ser letal. Los cristales que se forman en el exterior también pueden dañar algunas células al romper su membrana, pero además, si su crecimiento es excesivo, recluyen a las células en estrechos canales, presionándolas y provocando cambios de forma que pueden ser irreversibles. Por otra parte, el aumento de la concentración de solutos en el exterior y el interior de la célula es también perjudicial: algunos iones son dañinos a altas concentraciones, pueden producirse variaciones en el pH y el cambio en la composición del medio puede afectar la acción de las proteínas y canales de permeabilidad. Además, el estrés osmótico provoca un flujo de agua hacia el exterior de la célula durante la congelación y hacia el interior durante la descongelación. Como esta última debe ser rápida, la entrada masiva



de agua (el proceso inverso a la congelación) puede producir un incremento de volumen excesivamente rápido, de forma que la membrana y el citoesqueleto no pueden adaptarse a la nueva disposición y se produce la rotura de la célula. El diseño de unas velocidades adecuadas de congelación /descongelación, junto con la adición de CPTs debe disminuir la formación de cristales y facilitar la deshidratación celular.

La dilución en los CPTs es también una fase crítica y, en general, se recomienda reducir la concentración y el tiempo de exposición al mínimo posible. Su efecto tóxico no está bien caracterizado, pero además de posibles interacciones con los componentes de la célula, muchos de los daños que producen están relacionados con su efecto osmótico. La incorporación de muchos CPTs, como el DMSO, incrementa la osmolaridad del medio y provoca disminución y aumento del volumen celular durante su incorporación al medio y posteriormente a la célula. Por eso, en muchos protocolos se recomienda su incorporación progresiva en varias etapas y la eliminación posterior con varios lavados.

La extensión de los daños celulares depende por tanto del diseño de un protocolo adecuado, pero también de las características de la célula: de su relación superficie/volumen, de su permeabilidad al agua y los CPTs, su sensibilidad al frío, el tipo de lípidos de su membrana y la composición de su citoplasma, el grado de empaquetamiento de la cromatina, etc. Son tantos los factores que es difícil predecir la respuesta de una célula a un determinado protocolo de congelación, a pesar de conocer uno o más de dichos factores. Por eso, la mayoría de los protocolos se han desarrollado de forma empírica aunque, cada vez más, se intenta profundizar en el conocimiento de la citofisiología para conseguir aumentar la fracción de células no dañadas. Por sus características, los espermatozoides son, probablemente, las células mas propicias para resistir el proceso.

Tras la criopreservación siempre encontraremos células dañadas. En el caso de los espermatozoides una suspensión nunca es homogénea y habrá células con diferente grado de resistencia. Los daños mas comunes afectan a la membrana (roturas, reorganizaciones, o pérdida de la permeabilidad selectiva, etc.), las mitocondrias (rotura, disminución



de su funcionalidad y reducción de los niveles de ATP en la célula), el citoesqueleto (desorganización), y en ocasiones el material genético (descondensación, roturas y pérdida de pequeños fragmentos). Entre los mamíferos y los esturiones, también es frecuente que los espermatozoides congelados sufran rotura del acrosoma (una estructura que no presentan los teleósteos) iniciando un proceso llamado reacción acrosómica, que solo debería ocurrir en presencia del ovocito. Algunos de estos daños son letales y otros no causan la muerte celular, pero afectan a la supervivencia a largo plazo o a la realización de funciones concretas. Un espermatozoide debe ser capaz de desplazarse hasta el ovocito, reconocerlo, fusionar su membrana con él, introducir su material genético y contribuir al desarrollo del futuro embrión con un material genético en perfectas condiciones. Cualquier alteración que interfiera en alguna de esas funciones convertirá al espermatozoide en una célula no funcional.

El diseño de un protocolo de criopreservación seminal debe tratar de incrementar al máximo la proporción de células resistentes al proceso, de forma que, aunque se produzca una pérdida de calidad, la población de células funcionales pueda garantizar una buena tasa de fecundación. Además, es conveniente adaptar el método de fecundación para facilitar la función de estas células que, casi siempre, presentarán peor calidad.

7.2.4. Diseño de un protocolo de criopreservación

Los puntos clave que han de definirse durante el diseño de un protocolo de criopreservación son los siguientes:

1. Método de recogida de las muestras
2. Selección de las muestras aptas para la criopreservación
3. Selección del diluyente: solución base y CPTs
4. Método de refrigeración (si es preciso)
5. Sistema de envasado
6. Método de congelación: instrumental y rampas de temperatura.
7. Descongelación: temperatura y tiempo requeridos
8. Eliminación de los crioprotectores (si es necesario)
9. Método de fecundación



7.3. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE PECES

Según las distintas revisiones bibliográficas, hasta la fecha se ha intentado la criopreservación de más de 200 especies de peces (40 de ellos marinos y el resto de agua dulce) y se han obtenido resultados muy variables. Muchos de los estudios utilizan métodos empíricos y hasta fechas recientes no se han comenzado a hacer análisis sistemáticos sobre los efectos causados por la criopreservación que permitan una aproximación más científica y una adaptación de los protocolos a las particularidades de los espermatozoides de peces, muy diferentes de los de mamíferos.

7.3.1. Particularidades de la fisiología espermática de peces

Los espermatozoides de peces llegan hasta el ovocito moviéndose en el agua que les rodea. Durante ese trayecto están sometidos a un medio agresivo que en un corto plazo de tiempo causa la muerte del espermatozoide (en especial en los peces de agua dulce). Son células, por tanto, con una vida media muy corta y con escasa capacidad para producir energía en forma de ATP. Los espermatozoides no son móviles en el plasma seminal. Su movilidad se activa al ser liberados en el agua como consecuencia de distintos factores según las especies: variaciones en la presión osmótica del medio, en el pH o en el contenido en distintos iones (Alavi y Cosson, 06). Una vez que la motilidad se ha activado su duración es muy breve, variando según las especies entre unos segundos (salmónidos) y unos minutos (algunas horas en los arenques). Por eso es muy importante que durante el proceso de dilución y congelación no se produzca la activación del espermatozoide, que desgastaría sus reservas energéticas e impediría su funcionamiento posterior. Por otra parte, los ovocitos de peces están rodeados por una envuelta rígida que los espermatozoides no pueden atravesar, por lo que presentan uno o más canales de entrada para los mismos (micropilos). Por ello, los espermatozoides no tienen acrosoma (necesario para degradar las envueltas del ovocito), a excepción de los esturiones, que poseen una estructura parecida. Además, los mecanismos de reco-



nocimiento y fusión al ovocito son prácticamente desconocidos, pero lógicamente han de residir en la membrana que rodea la cabeza.

Otra particularidad importante reside en la cantidad de huevos que han de ser fecundados con una dosis seminal. El número de ovocitos producidos por una hembra de mamífero difícilmente supera las decenas, mientras que en peces las puestas de huevos pueden ser millonarias. En mamíferos se puede recurrir a técnicas de inseminación que permiten reducir tremendamente el número de espermatozoides necesarios (inseminación intrauterina, *in vitro*, microinyección espermática, etc.) por ello, tras la descongelación y, dada la longevidad de estos espermatozoides, se puede seleccionar la población de células con mejores características y emplear este pequeño porcentaje en la fecundación posterior. En peces, el porcentaje de espermatozoides funcionales no puede reducirse en exceso, porque impediría la obtención de tasas de fecundación razonables.

Por ello, el protocolo debe ajustarse y optimizarse teniendo en cuenta todos estos factores:

7.3.2. Diseño de un protocolo para congelación de esperma de peces

7.3.2.1. Obtención del esperma

El método habitual es en muchas especies es el masaje abdominal. Normalmente se aplica un masaje previo para vaciar la vejiga de la orina y evitar contaminaciones. Este método puede ser válido cuando vamos a fecundar con semen fresco inmediatamente después de la extracción. Sin embargo, cuando vamos a congelar, la calidad del semen ha de ser la máxima posible, evitando todo tipo de contaminación por orina, heces, mucus o sangre. La orina puede provocar la activación de la movilidad, inutilizando los espermatozoides. Por ello es sumamente importante emplear un método limpio, aunque el rendimiento sea menor. En primer lugar se debe vaciar la vejiga de la orina y secar la zona y es recomendable que los animales no hayan comido las 24h antes. Uno de los métodos utilizados es la canulación: hay que hacerla con sumo cuidado, utilizando una cánula adecuada a la especie, de punta roma. En algunas especies como la carpa o el rodaballo la anatomía



del animal no permite ésta práctica. En éstas y en las especies más pequeñas, el semen puede extraerse mediante absorción desde la papila genital con una jeringa sin aguja, secando previamente la zona para no absorber agua o mucus. Otra solución es la aspiración con un artilugio desde la papila urogenital. Algunos investigadores optan por la recogida en un recipiente que contiene una solución salina cuya composición inactiva la motilidad espermática, con el fin de diluir las posibles contaminaciones y minimizar sus efectos. En este caso, el semen debe ser posteriormente centrifugado, para eliminar el diluyente y el plasma, y resuspendido en una solución que imite la composición del plasma seminal. Normalmente esta manipulación no tiene efectos negativos sobre la calidad seminal. No obstante, esta práctica presenta algunos inconvenientes, ya que los diluyentes son medios minerales que no



FIGURA 4.

Extracción espermática en trucha mediante: a) masaje abdominal, b) canulación, c) aspiración d) sacrificio, extracción testicular y obtención de semen mediante cortes.



contienen otros elementos del plasma que pudieran ser importantes. Así Lahnsteiner (2007) ha identificado en el plasma seminal de trucha arco iris diferentes proteínas, cuya presencia aumenta la motilidad y la viabilidad espermática.

En aquellas especies en las que hay que recurrir al sacrificio del animal se suele obtener el semen por maceración del testículo. Sin embargo, cuando el semen va a ser congelado es preferible extraer el semen mediante la realización de cortes con bisturí, y la recogida del espermatozoide que se libera por goteo, lo que reduce la contaminación con eritrocitos y otras células. En cualquier caso, todas las muestras que presenten restos de sangre, orina o heces han de ser desechadas.

Hasta el momento de la congelación y desde su extracción, el semen debe ser mantenido en condiciones adecuadas: a 4 °C (en frigorífico o sobre hielo, pero sin contacto directo con éste) y en atmósfera con suficiente oxigenación.

7.3.2.2. Selección del espermatozoide: evaluación de la calidad seminal

Todos los estudios realizados con peces demuestran una gran variabilidad de resultados entre especies, poblaciones, individuos de la misma población e incluso entre distintas recogidas del mismo individuo. Estas diferencias se pueden deber a diferencias en la alimentación, la temperatura de mantenimiento, las características genéticas o la época de la estación reproductora. Se ha observado que tanto la dieta como la temperatura a la que ocurre la espermatogénesis afectan a la composición de los espermatozoides y por tanto a su resistencia a la congelación. En general la utilización de reproductores sometidos a fotoperiodo artificial, que maduran en épocas en que la temperatura es la opuesta a la de la época normal de maduración, son menos resistentes a la congelación (Robles et al, 2003). La composición del plasma seminal varía a lo largo de la estación reproductora y, quizás también por ello, se modifica la respuesta a la criopreservación. Se considera que el semen obtenido en mitad de la época reproductora es el más adecuado para su conservación en frío. Debido a la diferente sensibilidad de las muestras seminales y a la pérdida de calidad que sucederá durante la congelación/descongelación, es muy importante realizar



una evaluación de la calidad previa al proceso, con el fin de seleccionar las muestras aptas. Ésta evaluación debe ser rápida, ya que no puede transcurrir mucho tiempo desde la extracción hasta el procesamiento.

La calidad espermática se define como la capacidad para fecundar un ovocito y producir una descendencia viable. Habitualmente se emplean diferentes parámetros para predecirla, desde la medida del volumen y concentración espermática, al análisis de las características del plasma seminal (pH, osmolalidad, concentración de diferentes iones) o la evaluación del estado de los espermatozoides (morfología, integridad de su membrana plasmática, producción de ATP y, especialmente, motilidad). Ninguno de ellos es suficiente para realizar una predicción fiel de la calidad, y menos aun de la calidad tras la descongelación, pero la combinación de varios métodos de evaluación ayuda a descartar las muestras no aptas.

El método de evaluación más empleado es la determinación de la motilidad, debido a la rapidez y sencillez con que puede realizarse. Algunos autores sugieren que hay buena correlación motilidad-fertilidad post descongelación (Lahnsteiner, 2000), pero según otros la buena motilidad inicial no garantiza los resultados finales (Cabrita et al 05). Como hemos mencionado, la motilidad se inicia tras la dilución en el medio acuoso. Tal y como describen Alavi y Cosson (2006), en los salmonídeos y los esturiones la alta concentración de K^+ en el plasma inhibe la motilidad. La liberación al agua hace descender ésta concentración y pone en contacto a las células con un medio con menor osmolalidad, lo que desencadena en las células la señal que inicia el batido del flagelo. En ciprínidos y otros peces de agua dulce, es el descenso de osmolalidad el factor activador, mientras que en la mayoría de los peces de agua salada, el aumento de la concentración osmótica del medio es el factor desencadenante. En cualquier caso, para evaluar la motilidad es necesario, en primer lugar, diluir la muestra en una solución no activadora, que permita una observación de los espermatozoides y, posteriormente, realizar una segunda dilución con una solución activadora, seguida de la inmediata observación, dada la brevedad del movimiento. Tradicionalmente estas valoraciones se han realizado mediante observación al microscopio, de una manera subjetiva, calificando las muestras en una escala de 1 a 5 en función del porcentaje de células



con movimiento progresivo u otras escalas arbitrarias. La grabación en vídeo y la observación por varios evaluadores reduce la subjetividad del método. Actualmente se emplean sistemas computerizados que permiten analizar el movimiento de cada una de las células y proporcionan información acerca de la duración, velocidad y trayectoria. Una excelente revisión de Rurangwa y cols. (2004) muestra cómo estas herramientas permiten realizar una predicción mucho más ajustada de la calidad espermática. En cualquier caso, la utilización de estos sistemas no siempre correlaciona con la calidad seminal tras la descongelación, pero sí es cierto que las muestras con baja motilidad inicial responden peor y por eso su eliminación reduce los malos resultados, aunque no garantiza la «aptitud» del resto de las muestras.

La determinación del volumen y concentración espermática puede indicar si el animal está o no en el momento óptimo, ya que unos recuentos bajos pueden reflejar que la muestra ha sido recogida al principio o al final del periodo reproductor y, por tanto, el semen será de baja calidad (Glogowsky *et al.*, 1996). Además permite establecer las dosis necesarias para la fecundación, ya que es necesario utilizar una adecuada proporción espermatozoides/ovocito, así como establecer la dilución que se requiere para criopreservar.

Las desviaciones del pH o la osmolalidad del plasma seminal respecto de la media de la especie, pueden indicar contaminaciones de la muestra con orina, lo que reduce la calidad del semen. Junto con la concentración espermática, estos parámetros permiten hacer una primera selección y eliminar aquellas muestras que no reúnan los requisitos mínimos.

La evaluación del estado de los espermatozoides (viabilidad espermática) es muy importante. La integridad de la membrana plasmática es fundamental en el proceso de fecundación y de ella depende en gran medida el metabolismo y la motilidad de los espermatozoides. Esta estructura está sometida durante la congelación a estrés osmótico, térmico, químico, mecánico y oxidativo (Parks y Graham, 1992). Para valorar éste parámetro puede analizarse la presencia de enzimas citosólicas liberadas al plasma por la rotura de las células (Ciereszko y Dabrowski, 1995; Lahnsteiner *et al.*, 1996), pero la utilización de marcadores fluorescentes específicos es más frecuente en la actuali-



dad. Algunos de ellos penetran en las células dañadas, mientras que otros son retenidos por las células con la membrana intacta, permitiendo diferenciar entre las células cuya membrana mantiene o no la permeabilidad selectiva. La identificación y cuantificación puede realizarse utilizando la microscopía de fluorescencia o la citometría de flujo (equipamiento más costoso, pero más riguroso). Porcentajes de células viables inferiores a un 70-80 % indican muestras no aptas para la congelación.

La presencia de una membrana plasmática íntegra no indica necesariamente que la célula soporte el estrés osmótico que representa la dilución en el medio en que tendrá lugar la fecundación. Por ello se han desarrollado métodos de detección de la resistencia de la membrana plasmática al choque osmótico que correlacionan con la resistencia de las células a la congelación/descongelación. Sólo aquellas muestras de semen fresco que poseen un porcentaje elevado de espermatozoides resistentes al choque presentan tras la descongelación un porcentaje de células viables suficientes para garantizar la fecundación (Cabrita et al, 1998). Lógicamente este test no puede realizarse en piscifactoría ni en condiciones de campo, pero sí en laboratorios especializados.

La combinación de diferentes parámetros (movilidad viabilidad celular y resistencia de la membrana al choque osmótico, por ejemplo), sí nos permite seleccionar las muestras más resistentes y por tanto más aptas para la criopreservación (Cabrita et al, 2001, 2005).

El tiempo que puede permanecer una muestra sin congelar es variable según las especies, pero en general se recomienda que sea el mínimo posible. En salmónidos no es recomendable mantenerlo mas de unas pocas horas, pero la tilapia *O. Niloticus* parece resistir bien un almacenamiento de hasta 6 días antes de la congelación (Rana et al 1990). En los peces de agua templada o caliente puede ser conveniente realizar una refrigeración progresiva hasta los 4 °C.

7.3.2.3. Selección del diluyente: composición de la solución base y los CPTs

Los diluyentes deben reducir la concentración espermática para facilitar la incorporación de los CPTs a todas las células. Los primeros diluyentes utilizados trataron de imitar la composición del plasma



seminal. Se han utilizado soluciones salinas tamponadas, medios de cultivo y sencillas soluciones a base de azúcares o de NaCl. Su efectividad depende de la especie y la población y siempre es necesario que mantengan una osmolalidad y una concentración iónica que impida la movilidad. La tendencia general es a simplificar las soluciones.

Muchos diluyentes contienen azúcares, ya que la fructosa es un componente del plasma seminal. La concentración varía entre 4 y 600 mMol y según las especies parece que los efectos de la sacarosa, maltosa, trehalosa, galactosa, fructosa y glucosa podrían ser equivalentes. El pH varía en los distintos protocolos entre 5,2 y 8,5, sin que se tenga claro el modo de predecir el pH óptimo. Como tampones se han utilizado tampones fosfato, tris o bicarbonato potásico. Lo conveniente es ensayar en una población el o los diluyentes que, según la bibliografía, hayan proporcionado mejores resultados. Uno de los más utilizados es el formulado por Mounib en 1978 (sacarosa 0,125 M, bicarbonato de potasio 0.1 M y glutatión reducido 0.0065 M en agua destilada), que se ha aplicado con diferentes variaciones y aditivos para semen de trucha, rodaballo o lubina entre otros.

En cuanto a los crioprotectores, para la congelación de semen habitualmente se usan CPTs permeables. El más utilizado es el DMSO, que da buenos resultados en muchas especies en concentraciones comprendidas entre el 5 y el 15 %. En un menor número de especies el glicerol parece mas adecuado (en aquellos que el plasma seminal ya contiene algo de glicerol), el metanol ha dado buenos resultados en el títalo y las tilapias y otros como el DMA también parecen funcionar en algunas especies de salmónidos. Lahnsteiner, que ha investigado la fisiología y conservación del esperma de muchos salmónidos, ha diseñado un protocolo estándar para este grupo de peces en el que sugiere utilizar mezclas de diferentes CPTs (DMSO, glicerol y sacarosa) (Lahnsteiner *et al.*, 1995). Pocos protocolos incluyen CPTs externos, pero sí se ha comprobado el efecto beneficioso de los estabilizadores de membrana. El mas utilizado es la yema de huevo al 10 %. En muchas especies su uso mejora mucho la motilidad espermática y la resistencia al choque osmótico. La leche en polvo desnatada también se ha mostrado beneficiosa por ejemplo en rodaballo. No obstante, ese aumento de la motilidad y la resistencia de la membrana no siempre se ve



acompañado de un aumento de la fertilidad tras la descongelación, ya que probablemente existen otros daños subletales o interacciones con elementos de la membrana que impiden al espermatozoide realizar el resto del proceso de fecundación. En trucha arco iris y trucha común, los extractos de proteína de soja añadidos al medio en un porcentaje del 7 % aumentan tanto la motilidad como la fertilidad del semen descongelado (Cabrita et al, 1999).

CUADRO 1.

Composición de diferentes diluyentes para criopreservación de esperma de distintas especies de peces (Maise, 1996).

Species	NaCl	KCl	CaCl ₂ 2H ₂ O	MgSO ₄ 7H ₂ O	Buffer (mM)	Sugar (mM)	Authors
<i>Acipenser baerii</i>	0	0.2	0	0	Tris 30	sacch 23.4	Billard <i>et al.</i> , unpublished
<i>Acipenser baerii</i>	0	0	0	0	Tris 118	sacch 18	Tsetkova <i>et al.</i> , 1996
<i>Cyprinus carpio</i>	128	2.7	0.9	0	NaHCO ₃ 2.4		Kurokura <i>et al.</i> , 1984
<i>Cyprinus carpio</i>	100	100	0	0	Tris 20		Cognié <i>et al.</i> , 1989
<i>Cyprinus carpio</i>	75	83	2	0.8	NaHCO ₃ 2.4		Kurokura <i>et al.</i> , 1984
<i>Dicentrarchus labrax</i>	171	0	0	0	Tris 20		Billard 1984
<i>H. hippoglossus</i>	0	0	1.7	7	glyc. 86 Tris 30		Billard <i>et al.</i> , 1993
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	101	23	4.6	6	Tris 20		Büyükhapoglu and Holtz 1978
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	35	18	0	0	Ami-meth. prop. 60		Kurokura and Hirano 1980
<i>Thunnus thynnus</i>	0	100*	0	0		sucr. 125	Doi <i>et al.</i> , 1990
<i>Oreochromis sp.</i>	111	40	2	0	NaHCO ₃ 2.4		Rana and McAndrew 1989
<i>Sparus aurata</i>	150	0	1.7	1	glyc. 83 Tris 20		Chambeyron and Zohar 1990
<i>Aspius</i>						gluc 300, sucr 300/600	

*KHCO₃



Una vez formulado el medio, el semen ha de diluirse en él en una proporción que varía normalmente entre 1:1 y 1:10 (semen:diluyente). En tilapia se considera adecuada la dilución 1:1, en salmónidos 1:3, pero en carpa se usan diluciones de hasta 1:9 y en el mero hasta 1:20. Después de realizarse la dilución, la mezcla ha de mantenerse a 4 °C durante un tiempo de equilibrado que permita al CPT entrar en las células, pero que no cause daños por toxicidad. Normalmente varía entre 5 y 15 min y es el tiempo que se emplea en envasar la mezcla. Lo más recomendable es trabajar en una cámara frigorífica, sobre una mesa refrigerada o con el material sobre hielo picado cubierto con un paño, para evitar el contacto directo con éste.

7.3.2.4. Envasado

La congelación se puede hacer en pequeñas gotas (pellets), que se dejan caer sobre una placa de hielo seco (nieve carbónica), en la que se hacen unos pequeños agujeros con una pieza metálica caliente. Las gotas se congelan y después pueden almacenarse en nitrógeno líquido. Es un método sencillo que requiere pocos equipamientos, pero el manejo posterior de las piezas congeladas es bastante incómodo. Por eso normalmente se envasa el semen en pajuelas de material plástico de diferentes volúmenes (Fig. 5) o, más raramente en viales especiales

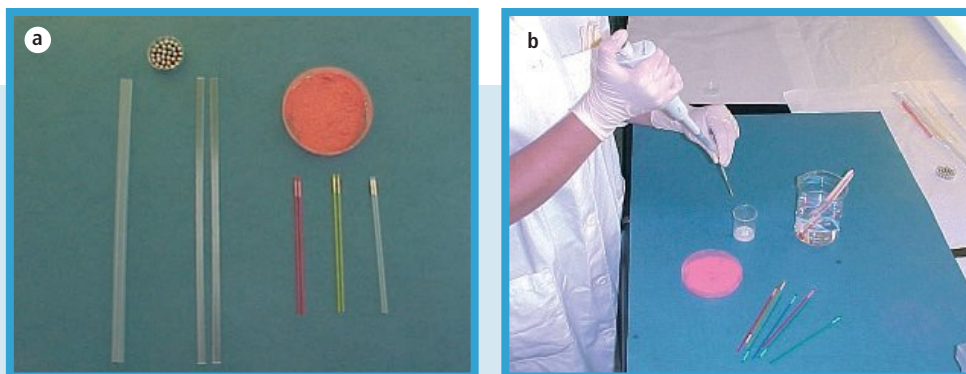


FIGURA 5.

- a) Pajuelas de 5 ml, 1,8 ml (sección plana) y 0,5 ml (de diferentes colores para identificación). Sobre ellas, bolitas metálicas y placa con PVA para sellado.
b) Llenado de una pajuela con micropipeta.



(crioviales) de mayor capacidad (de 1 a 5 ml). Las pajuelas más utilizadas, en principio diseñadas para semen de toro, tienen una sección circular y una capacidad de 0.25 ó 0.5 ml. El envasado se puede hacer con la ayuda de pipetas o de sistemas de aspiración que se ajustan a una bomba de vacío. Después se sellan con un material que polimeriza al contacto con el agua (PVA), con calor, o con bolitas metálicas apropiadas. Existen también pajuelas de mayor volumen (y mayor diámetro) que se utilizan con menos frecuencia porque proporcionan peores resultados, como veremos mas adelante.

7.3.2.5. Congelación: instrumental y rampas de temperatura

Como hemos dicho existe la posibilidad de congelar sobre hielo seco, pero es más recomendable utilizar nitrógeno líquido (N_2l). Existen en el mercado diferentes congeladores programables que inyectan el N_2l en una cámara, donde se depositan las pajuelas. La velocidad de entrada del nitrógeno, y por tanto la rampa de temperatura, puede programarse. En los peces de agua caliente es conveniente realizar una congelación en dos fases. En carpa, se suele congelar a una velocidad de $-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ desde $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$, luego se aumenta la velocidad a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta que se alcanzan los $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ y desde esa temperatura se almacenan en nitrógeno líquido. Las muestras de tilapia, se refrigeran desde los $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ a una velocidad

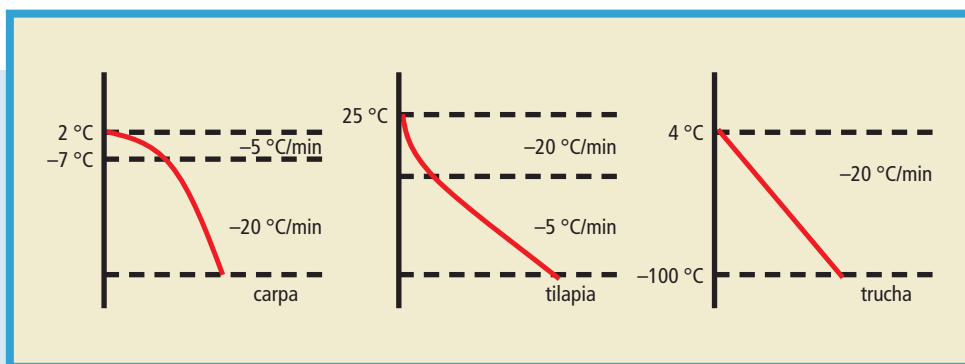


FIGURA 6.

Rampas de temperatura utilizadas con distintas especies.



de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y desde esa temperatura hasta $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ se reduce la velocidad a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Los salmónidos admiten una velocidad homogénea hasta $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$, que suele estar comprendida entre -20 y $-30\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Los congeladores programables no están al alcance de cualquier productor ni son los más adecuados para trabajar en condiciones de campo. Por eso también se utilizan con éxito otros dispositivos más sencillos, tales como accesorios que se colocan en el cuello de los tanques de N_2l y van sumergiendo las pajuelas en los vapores de nitrógeno o -el método más común- cajas aislantes de poliestireno. El fondo se rellena de N_2l y las pajuelas se dejan sobre un recipiente flotante que se mantiene a una distancia adecuada de la superficie del nitrógeno. La distancia, según las especies, el diámetro de la pajuela o el diluyente, varía entre 2 y 6 cm. Tras un tiempo en esa posición (10-20 min), el semen alcanza una temperatura de -90 a $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$, pudiendo ya sumergirse en el nitrógeno.

Para almacenar las muestras congeladas se utilizan tanques especiales, que contienen soportes para las pajuelas y deben mantenerse siempre con el nivel adecuado de Nitrógeno líquido. Es conveniente que sean almacenados en cámaras frías para reducir la evaporación.

El manejo de N_2l requiere ciertas precauciones y el uso de equipos de seguridad (guantes y máscaras) por su peligrosidad, ya que puede producir quemaduras, debido a su baja temperatura y asfixia, al desplazar al oxígeno durante su evaporación.

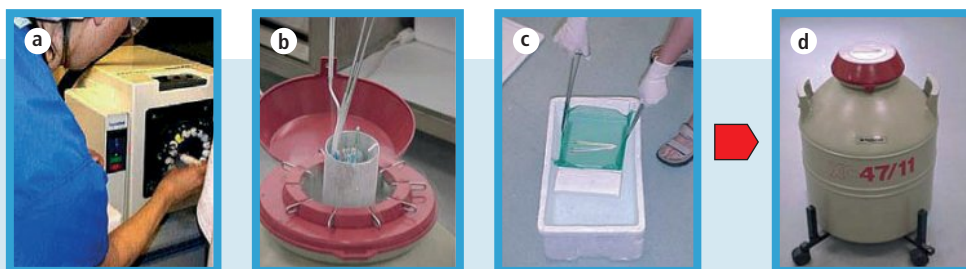


FIGURA 7.

Congelación a) en un dispositivo programable, b) en el cuello de un tanque de N_2l y c) en un soporte flotante dentro de una caja de poliestireno. d) Tanque de almacenamiento de muestras.



7.3.2.6. Descongelación

Si la congelación ha sido adecuada y no se han formado cristales de hielo, los daños que se pueden causar durante esta fase no son graves. Los pellets se descongelan sumergiéndolos en solución de fertilización, a una temperatura algo superior a la fisiológica ($\approx 10^\circ\text{C}$ para peces de agua fría y $25\text{--}30^\circ\text{C}$ para especies de aguas cálidas).

Las pajuelas se descongelan en un baño de agua. La temperatura y tiempo necesarios han de establecerse previamente para conseguir la descongelación completa evitando el calentamiento de la muestra y varían en función del tamaño de la pajuela.

FIGURA 8.
Descongelación de una pajuela
de 0,5 ml con semen de trucha
arco iris en baño de agua a
 25°C y fecundación inmediata
de la puesta.



7.3.2.7. Fecundación

Los espermatozoides van a quedar dañados tras la descongelación, parte de ellos no serán capaces de moverse y el resto tendrán una motilidad muy breve. Además la pérdida de calidad es rapidísima de forma que, aun en las mejores condiciones, si tratamos de activar la motilidad un tiempo después de la descongelación no lo conseguiremos. Por eso la fecundación debe hacerse de inmediato, vertiendo el semen directamente desde la pajuela sobre los huevos. La pérdida de motilidad no es, sin embargo, lo más importante. Las células se vuelven muy frágiles y muchos espermatozoides, aun los móviles, no serán capaces de alcanzar los micropilos antes de sufrir la lisis. Por eso, en lugar de agua, normalmente se utilizan soluciones diseñadas para activar y prolongar el movimiento o para reducir los daños que provoca el choque osmótico. Entre las sustancias activadoras están la cafeína o la teofilina (en concentraciones de aprox. 5mM). Para minimizar el choque osmótico en trucha conviene activar el movimiento con una



solución salina 250mOsm y pH9. Existen distintas formulaciones, pudiendo utilizarse incluso soluciones simples de NaCl. Además, la proporción espermatozoides/huevo debe ser más elevada que cuando se utiliza semen fresco.

7.3.2.8. Instalaciones y equipamientos necesarios

El procedimiento puede hacerse de forma simple, en condiciones de campo, en aquellas muestras que no pueden ser trasladadas a un laboratorio especializado o de forma más controlada, con el fin de garantizar la calidad posdescongelación y la conservación fiel del material, pero siempre ha de ser realizada por personal entrenado.

El equipamiento mínimo para trabajar en condiciones de campo dependería de la preparación previa de los medios en un laboratorio y consistiría en una superficie limpia y seca de trabajo, microscopio para evaluación básica de la motilidad, hielo picado, pajuelas, pipetas y vasos de precipitados para realizar diluciones, caja de poliestireno, soporte flotante (catamarán de poliestireno con red plástica), pinzas quirúrgicas largas, guantes criogénicos, suministro de N₂l, contenedor de N₂l para almacenamiento, termómetro y baño de agua para descongelación.

El equipamiento óptimo consiste en un área limpia y seca para la extracción de esperma, un laboratorio para evaluación seminal dotado con sistema computerizado de evaluación de la motilidad (C.A.S.A.), microscopio de fluorescencia, citómetro de flujo, osmómetro, pHímetro, etc, equipamiento para preparación de diluyentes, área a 4 °C para manipulación del esperma, equipos programables de congelación, tanques de almacenamiento de muestras monitorizados para evitar la evaporación del N₂l y baños programables para la descongelación.

7.3.3. Especies de interés comercial: resultados actuales y métodos de congelación

7.3.3.1. Congelación de semen de peces marinos

Los espermatozoides de peces marinos son, generalmente, mas resistentes a la congelación y muchas especies se consiguen tasas de fecundación semejantes con semen fresco y criopreservado. Se ha su-



gerido que la diferencia con los de agua dulce podría estar en la distinta composición de sus membranas, ya que tienen diferente proporción colesterol/fosfolípidos y tienen más cantidad de fosfatidilcolina, lo que les proporciona, en teoría, una mayor fluidez y resistencia a la congelación. Son células adaptadas a la supervivencia en una solución salina y sus mecanismos de osmorregulación son diferentes. La fecundación se realiza en un medio menos dañino, por lo que pueden permitirse una mayor supervivencia y están dotados de un mayor número de mitocondrias que permiten una movilidad más duradera, al recuperar el ATP que pierden durante el movimiento. Los daños que produce la congelación en su maquinaria energética no son tan grandes y su membrana no va a exponerse a un medio tan agresivo. Por tanto, la funcionalidad no se reduce de forma tan dramática tras la descongelación.

De las aproximadamente 40 especies marinas sobre las que se han realizado ensayos, nos centraremos en las especies más cultivadas actualmente en nuestra región mediterránea: rodaballo, lubina y dorada. Para la primera (*Psetta maxima*) se han desarrollado protocolos que permiten obtener tasas de fecundación semejantes con semen fresco y congelado (Dreanno et al, 1997). La dilución del semen se realiza en solución de Mounib, con un 10 % de DMSO y un 10 % de BSA, en una proporción 1:2 y la congelación en pajuelas de 0.25cc en vapores de nitrógeno, a 6cm de la superficie del N₂l durante 15min, tras los cuales se sumerge directamente en él. La descongelación se realiza a 30 °C durante 5s. Se ha estudiado el desarrollo de las larvas obtenidas, comprobándose que la supervivencia, malformaciones y tasa de crecimiento son semejantes tras la utilización de los dos tipos de esperma (Suquet et al. 1998). Este método de congelación se usa ya en piscifactorías, donde permite un mejor manejo del esperma para la reproducción, la creación de bancos de semen de individuos de particular interés y el intercambio de material genético entre instalaciones. La simplicidad del método ha permitido la transferencia a la empresa en un plazo de tiempo breve y con una mínima inversión por parte de la misma.

El mismo protocolo ha sido adaptado al semen de lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Fauvel et al. 1998). Utilizando una dilución 1:3 y una tasa de congelación de -65 °C/min o situando las pajuelas a 6cm de



la superficie del N₂l, el semen conserva una buena motilidad tras la descongelación, pero la pérdida de calidad es mucho mas rápida que en el rodaballo, por lo que la fecundación ha de hacerse de inmediato. En esas condiciones y empleando dosis seminales más elevadas que en fresco (70.000 spztz / huevo), no hay una reducción de la fertilidad. No todas las muestras responden igual y algunos individuos son significativamente más sensibles al proceso, por lo que es importante una buena selección previa de las muestras. Los resultados muestran la congelación en viales o criotubos de 1.5ml permite fecundar con cada envase 100ml de puesta (aprox. 100.000 huevos).

En cuanto a la dorada (*Sparus aurata*), la dilución 1:6 (diluyente 1% NaCl en agua destilada, ajustado a 300mOsm/kg, al que se añade 5% DMSO y 10mg/ml BSA), el envasado en criotubos de 5ml, seguido de congelación a 1cm de la superficie del N₂l y descongelación en un baño de agua a 60 °C durante 30s, provoca una reducción en la calidad del espermatozoides, pero permite obtener tasas de fertilidad semejantes a las del semen fresco, fecundando con una dosis de $1,3 \times 10^5$ espermatozoides/huevo (3,5ml de semen descongelado / 20ml de huevos) (Cabrita *et al.* 2005)

Respecto a los peces planos la cantidad de información es menor. En lenguado se están iniciando los trabajos, debido al reciente desarrollo del cultivo intensivo de esta especie, pero aun no se han desarrollado protocolos satisfactorios.

7.3.3.2. Congelación de semen de peces de agua dulce

Los peces de agua dulce han sido mucho mas utilizados en estudios de criopreservación, tanto los peces de acuario, como las variedades locales en peligro de extinción o las especies de interés en acuicultura. La respuesta es en general más variable que la obtenida entre los peces de agua salada, pero también hay grupos que responden bien a la congelación. Dada la variedad de especies estudiadas nos centraremos en dos grupos de interés en nuestro entorno: ciprínidos y salmónidos:

- Los ciprínidos son uno de los grupos mas estudiados. Se han realizado muchos trabajos, tanto en especies con interés en piscicultura de carne, como en peces ornamentales. El mayor problema, como en la mayoría de las especies de agua dulce, sigue siendo



la gran variabilidad de resultados entre individuos e incluso entre eyaculados del mismo individuo, que es difícil de atribuir a un motivo concreto, así como el paso de pequeña escala a escala industrial o semi-industrial. Según Lahnsteiner (Lahnsteiner *et al.*, 2003), para una gran variedad de especies el mejor diluyente es una solución salina fisiológica tamponada (75 mmol/l NaCl, 70 mmol/l KCl, 2 mmol/l CaCl_2 , 1 mmol/l MgSO_4 , 20 mmol/l Tris), con un 10 % de DMSO y 0.5 % de glicina. Tras congelar (sin apenas periodo de equilibrado) en una caja de poliestireno a 4-5 cm del N_2I , descongelar a 25 °C durante 15 a 45s y fecundar activando con agua en una proporción $1,3\text{-}2,5 \times 10^6$ espermatozoides/huevo, se obtienen fertilidades de hasta el 92 % respecto del semen fresco, aunque el resultado depende en gran medida de la calidad inicial del semen.

- Los salmónidos son, con diferencia, las especies más estudiadas. Eso se debe a su gran importancia económica y a que son, probablemente, el grupo de peces en el que más difícil resulta lograr resultados repetibles y homogéneos. Se conoce mucho más sobre la fisiología espermática de los salmónidos que sobre la de otros grupos animales. Son numerosos los estudios sobre la iniciación de la motilidad, su duración, los patrones de movimiento o la composición del plasma seminal y, sin embargo, hasta hace muy poco tiempo no era posible evitar la variabilidad entre muestras ni conseguir el paso de pequeña a gran escala. El gran problema es que sus espermatozoides están preparados para sobrevivir un periodo de tiempo muy corto y el ovocito es muy grande y, en muchas especies, sólo posee un micropilo. Por eso son liberados junto a la puesta en grandes cantidades y, sólo aquellos que alcanzan el micropilo en escasos segundos tendrán éxito. El resto agotará enseguida las reservas de ATP y sufrirá el efecto de la dilución en agua dulce, que causará la muerte en pocos segundos. Si a estas células con estas características, las sometemos al proceso de congelación, la supervivencia quedará aun más comprometida. Por ello en este grupo es especialmente importante seleccionar las muestras aptas. El método más rápido es analizar la motilidad, la densidad espermática y/o la osmolaridad. Una medida más apropiada es la evaluación de la



resistencia de las células a su dilución en agua. Aquellas muestras que poseen un porcentaje más alto de células resistentes también resisten mejor el proceso de congelación. Según Ogier de Baulny et al (1997), tan solo el 18 % de los espermatozoides de trucha conservan intactas la membrana plasmática y la mitocondria. Por eso se ha hecho un gran esfuerzo en el estudio de protectores de membrana adecuados (Cabrita et al, 1999).

Se han diseñado protocolos para la congelación de trucha arcoiris, común, alpina, y trucha lacustre, savelino, salmón del Ártico, del Atlántico del Danubio y del Pacífico, timalo, etc. Parece existir acuerdo en que, en la mayoría de las especies, el DMSO es el crioprotector mas adecuado y en algunos protocolos se usa en combinación con otros como el metanol. Poco a poco se ha conseguido mejorar y homogeneizar los resultados a pequeña escala. El paso fundamental era dar el salto a la congelación de grandes volúmenes, ya que los salmónidos tienen una gran producción de semen y para fecundar un gran lote de huevos se requiere mucho esperma (entre 10 y 500 cc). Por eso no se puede depender de la congelación en pajuelas de 0,25 o 0.5ml, que podrían servir como reserva de un individuo especial, pero serían inmanejables en una piscifactoría. En trucha arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) han de utilizarse muestras con más de un 70 % de motilidad progresiva, y un 80 % de células viables. La dilución 1:3 en medio de congelación a base de CaCl_2 , MgCl_2 , Na_2HPO_4 , KCl, NaCl, ácido cítrico, glucosa, KOH y bicina, ajustado a 345 mOsm/Kg y pH 7.8, al que se añaden un 7 % de DMSO, 7,5 mg/ml de concentrado de proteínas de soja y 10 % de yema de huevo, proporciona buenos resultados en diferentes volúmenes. El envasado en pajuelas de 0,5 ml requiere la congelación a 2 cm de la superficie del N_2I durante 10min antes de su almacenamiento en el nitrógeno y la descongelación en baño de agua a 25 °C 30 s y proporciona tasas de fertilidad del 84 % respecto de semen fresco. El envasado en pajuelas de mayor diámetro y 5ml de volumen, requiere la congelación a 1cm de la superficie del N_2I y la descongelación a 60 °C durante 30s, proporcionando una fertilidad del 73 % respecto del mismo control fresco. La fecundación se realiza utilizando un medio salino como activador y $1,6 \times 10^7$ espermatozoides /huevo (Cabrita et al., 2001).



Este protocolo puede también utilizarse para la congelación de semen testicular de neomachos de trucha, es decir hembras genéticas productoras de esperma, que desarrollan testículos pero no espermíductos. El semen testicular ha de someterse a un tratamiento de maduración «in vitro» antes de su uso. Los espermatozoides son inmaduros, debido en parte a la imposibilidad de chequear su estado antes de la extracción y en parte a que no han sufrido los cambios que suceden durante su paso por los espermíductos. En este caso es especialmente importante la selección de las muestras que están en condiciones óptimas (Robles et al, 2003).

7.3.4. Utilización de los bancos de esperma para recuperación de poblaciones

La congelación de esperma sólo permite la conservación del genoma paterno, pero, debido al enorme desarrollo de las tecnologías de la reproducción en peces, puede ser suficiente para recuperar la población completa. Experimentos llevados a cabo con diferentes especies de esturión y con trucha arco-iris, demuestran que el semen congelado puede ser utilizado para producir una población androgenética.

En trucha arco-iris, Babiak et al (2002) obtienen los mismos porcentajes de androgenotes utilizando semen fresco o congelado. El procedimiento consiste en la fecundación de ovocitos cuyo núcleo se inactiva previamente mediante irradiación. Con el fin de conseguir una descendencia diploide, la primera división mitótica tras la entrada del espermatozoide se bloquea mediante un choque de presión, de forma que se obtienen individuos homocigóticos (hembras XX y machos YY). Mediante posteriores cruzamientos de éstos, es posible recuperar de nuevo la heterocigosis y la proporción y determinación sexual original (XX y XY) (Fig. 9). La supervivencia de los animales androgenéticos es muy reducida debido a su homocigosis, pero es similar utilizando semen fresco o congelado. Con éste último, Babiak et al (2002) han conseguido una tasa de supervivencia a los dos años del 0,9 %, insignificante desde un punto de vista productivo, pero muy interesante desde el punto de vista de la conservación de una población en riesgo.

Más interesantes aún resultan las experiencias llevadas a cabo con esturiones, que demuestran que, en diferentes especies del género

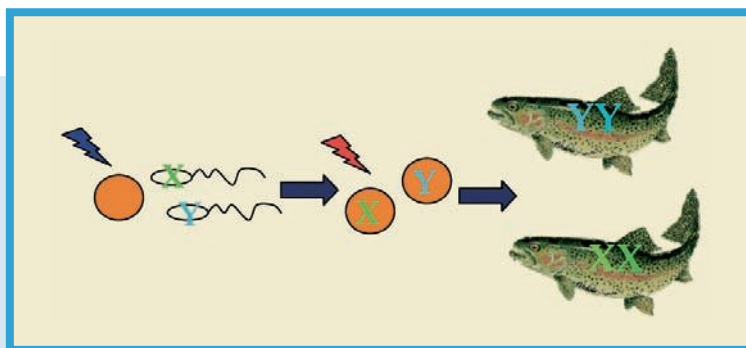


FIGURA 9.

Proceso de androgénesis en trucha: fecundación de ovocito inactivado y bloqueo de la primera división mitótica.

Acipenser, al realizar la fecundación utilizando una alta concentración de espermatozoides se produce polispermia (entrada al ovocito de más de un espermatozoide). Si posteriormente se da a la puesta un choque de calor, los pronúcleos masculinos se fusionan dentro del huevo. Con este procedimiento se ha conseguido realizar la androgénesis dispérmica, o fecundación de un ovocito inactivado con dos espermatozoides, de forma que el alevín resultante no es homocigótico, ya que procede de la fusión de dos núcleos espermáticos diferentes (Grunina y cols., 2006). La utilización de semen congelado de esturión estrella (*Acipenser stellatus*) para fecundar esturión belluga (*Huso huso*) ha permitido obtener individuos de la especie parental, cuyo desarrollo ha sido normal hasta los 10 meses.

7.3.5. Objetivos futuros en la congelación de semen

Considerando el estado actual de conocimientos, los objetivos más importantes de cara al futuro próximo son:

- La formulación de protocolos de congelación/descongelación para nuevas especies de interés.
- El paso de escala de laboratorio a escala de producción comercial. Para ello, muchas especies con gran producción seminal, requieren el salto a la congelación en mayores volúmenes, más complicado debido a las condiciones heterogéneas que se establecen



dentro de los envases durante la congelación/descongelación. Las investigaciones en protectores celulares (protectores de membrana, antioxidantes, etc) están proporcionando cada vez mejores resultados para grandes volúmenes.

- Diseño de activadores de la motilidad que incrementen la funcionalidad de los espermatozoides después de la congelación.
- Desarrollo de redes internacionales para la transferencia de tecnología e intercambio de recursos y apoyo técnico, así como para el establecimiento de protocolos estandarizados de control de calidad.
- Utilización del esperma (y como consecuencia de los bancos de semen), como portadores de construcciones génicas para la realización de líneas de peces transgénicos. Este objetivo ha sido ya conseguido con éxito en tilapia (*O. niloticus*) (Chen et al, 1998).

7.3.6. Congelación vs. conservación en fresco

En algunas especies es posible conservar la capacidad fecundante del semen durante horas o incluso días, manteniéndolo refrigerado (1-4 °C), diluido en medios específicos y con aireación. Frecuentemente los diluyentes empleados contienen antibióticos, con el fin de evitar la proliferación bacteriana y prolongar la vida de los espermatozoides. Recientemente se ha descrito un método simple de conservación en frío de semen de halibut del Atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*), con el cual se mantiene el porcentaje de células móviles durante 40 días, si bien el patrón de movimiento varía a partir de los 15 días de almacenamiento. Los ensayos de fecundación realizados tras 70 días proporcionaron tasas de fertilidad y de eclosión cercanas al 50 % en alguna muestra, aunque en la mayor parte no alcanzaron el 10 % (Babiak et al, 2006). Puede pensarse por tanto que esta conservación, mucho más simple y con menos requerimientos en cuanto a instalaciones y equipamientos podría emplearse en lugar de la criopreservación.

La congelación seminal presenta sin embargo ventajas significativas:

- La duración del almacenamiento es teóricamente indefinida, aunque en la práctica podría tener algún límite. Hasta el momento



las referencias más lejanas indican que a lo largo de 11 años de congelación no se han producido descensos en la calidad del semen de tilapia.

- No hay posibilidad de contaminación microbiana, ni es necesario el uso de antibióticos, que puede afectar a la viabilidad celular y mitocondrial.
- Es un método más adecuado para la conservación del genoma. El esperma refrigerado a 4 °C sufre daños oxidativos que afectan a la integridad del genoma. Estos daños pueden afectar a la variabilidad de la descendencia, y son suficientes como para inhabilitar el semen para su uso en programas de selección genética (Herráez et al, 2006).

La principal ventaja de la refrigeración es su simplicidad y su coste, mucho más reducido y puede ser el método de elección para periodos de almacenamiento muy breves, ya que produce menores pérdidas de viabilidad.

7.4. CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS

La criopreservación de ovocitos permitiría conservar el genoma materno. No obstante, como hemos mencionado previamente, ya en mamíferos la congelación de ovocitos resulta complicada debido a su tamaño, la estructura de su material genético, la presencia del huso meiótico y el contenido de su citoplasma. Los de peces, mucho mas grandes y con mas cantidad de lípidos, son hasta el momento imposibles de congelar, las investigaciones son recientes y no han proporcionado aún los resultados deseados. Actualmente se están realizando estudios sobre resistencia al frío y la permeabilidad de estas células en distintos estadios de maduración. Los investigadores coinciden en que los ovocitos de pez cebra, utilizado como modelo experimental, extraídos del ovario en estadio III ($\geq 0,5$ mm de diámetro), parecen ser los más adecuados. La aplicación de soluciones protectoras y rampas de congelación complejas, permite obtener un porcentaje de ovocitos con la membrana íntegra superior al 80 % (Guan y cols., 2006), pero no son capaces de continuar la maduración con posterioridad.



7.5. CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES (PUESTAS FECUNDADAS)

La congelación de embriones tendría la ventaja de permitirnos preservar indefinidamente el genoma paterno y materno y facilitaría la planificación de la reproducción en piscifactoría de acuerdo con las necesidades de la empresa, de forma que tras la fecundación y congelación, los embriones fueran puestos en incubación atendiendo a la demanda del mercado, la disponibilidad de instalaciones, los picos de trabajo, etc. Por otra parte, los embriones de peces son utilizados como bioindicadores en determinados test de ecotoxicidad, pero su disponibilidad está limitada a los momentos concretos de puesta y, en el caso de los laboratorios de toxicología, a la productividad de los acuarios que posean. La congelación permitiría la venta del material biológico de características conocidas y homogéneas en cualquier momento del año.

Lamentablemente, este objetivo está aun lejos de ser conseguido ya que los embriones de peces son mucho más difíciles de congelar que los de otros grupos animales. Los primeros intentos, como han revisado Billard y Zhang (2001), fueron realizados con especies de agua dulce, especialmente salmónidos, pero dadas sus características estructurales y su enorme tamaño, los resultados no fueron satisfactorios. La mayoría de los estudios que se han hecho con profundidad, tratando de conocer las características criobiológicas de los embriones, se han realizado con pez cebra (*Danio rerio*), especie modelo de fácil mantenimiento en acuarios. Su uso se justifica por el amplio conocimiento de su biología, su facilidad de mantenimiento y su producción de embriones. No obstante, dado que es una especie de agua dulce y templada (incubación a 28 °C), y a pesar de su utilidad como modelo experimental, podría no ser la más indicada para resistir la congelación/descongelación. Por eso, más recientemente se han iniciado ensayos con otras especies de agua salada y cuyos embriones tienen un diámetro reducido, como el rodaballo, la dorada y la solla roja, ésta última de aguas muy frías.

7.5.1. Características específicas de los embriones de peces:

Los embriones de teleósteos tienen un gran tamaño ($\varnothing$ entre 1 mm y 12-13 mm), están rodeados por una envuelta rígida –el



corion— con una permeabilidad selectiva, que les mantiene independizados del exterior. Dentro de ella se encuentran el embrión propiamente dicho, y el saco vitelino, con gran cantidad de lípidos, rodeado a su vez por la línea sincitial. Cada una de esas envueltas divide al embrión en varios compartimentos y tiene distinta permeabilidad al agua y a los solutos. Eso hace que sea muy difícil conseguir el flujo de agua y CPTs adecuado en todos y cada uno de los compartimentos. Además, la relación superficie/volumen es muy pequeña, lo que complica más el intercambio con el medio y, por tanto, la deshidratación y la entrada de CPTs. Por otra parte, el contenido del saco vitelino, con gran cantidad de lipoproteínas, es particularmente sensible a la congelación y su comportamiento osmótico es, probablemente, muy diferente al del compartimento celular. Esto hace más difícil el diseño de un protocolo de congelación adecuado para ambas estructuras.

Por otra parte los embriones de peces son especialmente sensibles al frío, y mueren a temperaturas próximas a los $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, por lo que no puede realizarse una congelación lenta, como la que ha sido descrita, ya que durante el paso por temperaturas de -20 a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ se produce la muerte embrionaria.

Tanto los datos de permeabilidad, como los de sensibilidad al frío indican que los estadios de desarrollo tempranos no son adecuados para realizar la congelación, siendo más apropiados los estadios más avanzados, en los que el embrión ya ha finalizado la gastrulación y muestra un desarrollo relativamente avanzado (5 somitos en pez cebra y esbozo caudal en rodaballo).

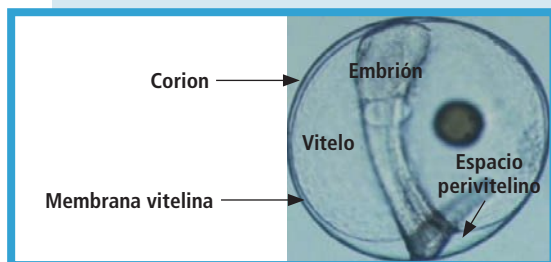


FIGURA 10.
Estructuras del embrión
de pez cebra (*Danio rerio*).



7.5.2. Métodos de congelación: congelación lenta y vitrificación

La congelación lenta, mediante el enfriamiento progresivo de los embriones, utilizando diferentes CPTs y rampas de temperatura, ha proporcionado resultados bastante decepcionantes (Billard y Zhang, 2001). Al disminuir la temperatura por debajo de -20 , -30 °C, y a pesar de los numerosos intentos, nadie ha conseguido ninguna supervivencia. Tal y como demostraron Hagedorn y sus colaboradores (Hagedorn et al, 2004), la formación de hielo en el interior del embrión sucede prácticamente de forma simultánea a la formación de cristales en el exterior, independientemente de la presencia en el medio de CPTs. Al ser tan reducida la diferencia en la temperatura de congelación interior y exterior, no hay tiempo para que se produzca la necesaria deshidratación, formándose cristales de hielo intracelulares, que causan la muerte embrionaria. La expresión de aquaporinas (canales de permeabilidad al agua) en la membrana de los embriones, no mejora los resultados. Por ello actualmente se contempla otra alternativa como más adecuada: la vitrificación o congelación ultrarrápida en soluciones con alta concentración de CPTs, que promueven la transición directa de la muestra al estado cristalino. La velocidad de congelación es tan grande, que antes de que se produzca formación de cristales de hielo y la deshidratación, todo el material queda solidificado formando un cristal de estructura amorfa (glassy solid state). Para ello se utilizan CPTs y agentes que aportan densidad al medio (lo que proporciona a la muestra la capacidad para vitrificar en lugar de congelarse) y se sumergen directamente las muestras en el nitrógeno líquido. Para hacernos una idea de las concentraciones de CPTs que son necesarias para vitrificar, el metanol es vitrificante a partir de una concentración 10 M y el propanodiol a partir de 5 M. El problema es conseguir que los embriones sobrevivan en estos medios tan agresivos y, además, que los CPTs entren en el embrión en la cantidad suficiente como para que las condiciones dentro del mismo también sean vitrificantes.

Se han hecho estudios de toxicidad con embriones de pez cebra, carpa, trucha o rodaballo. El DMSO es generalmente el menos tóxico y por ejemplo el pez cebra tolera bien una concentración 2 M durante



2 h y el rodaballo durante 1 h, pero si se aumenta la concentración a 3 M no resisten mas de 15 min. Otros CPTs resultan aun más tóxicos, por lo que parece imposible mantener los embriones en soluciones vitrificantes. Por eso se diseñan soluciones que contienen mezclas de diferentes CPTs, para que ninguno de ellos resulte tóxico y la mezcla de todos sea vitrificante. Además se suelen añadir CPTs no permeables, de alto peso molecular, que suelen ser menos tóxicos. Para rodaballo se han formulado soluciones vitrificantes sin efectos tóxicos, que son añadidas de forma progresiva en varias etapas, a base de DMSO, metanol, etilenglicol y diferentes CPTs externos (PVP, sacarosa o X1000®) tal y

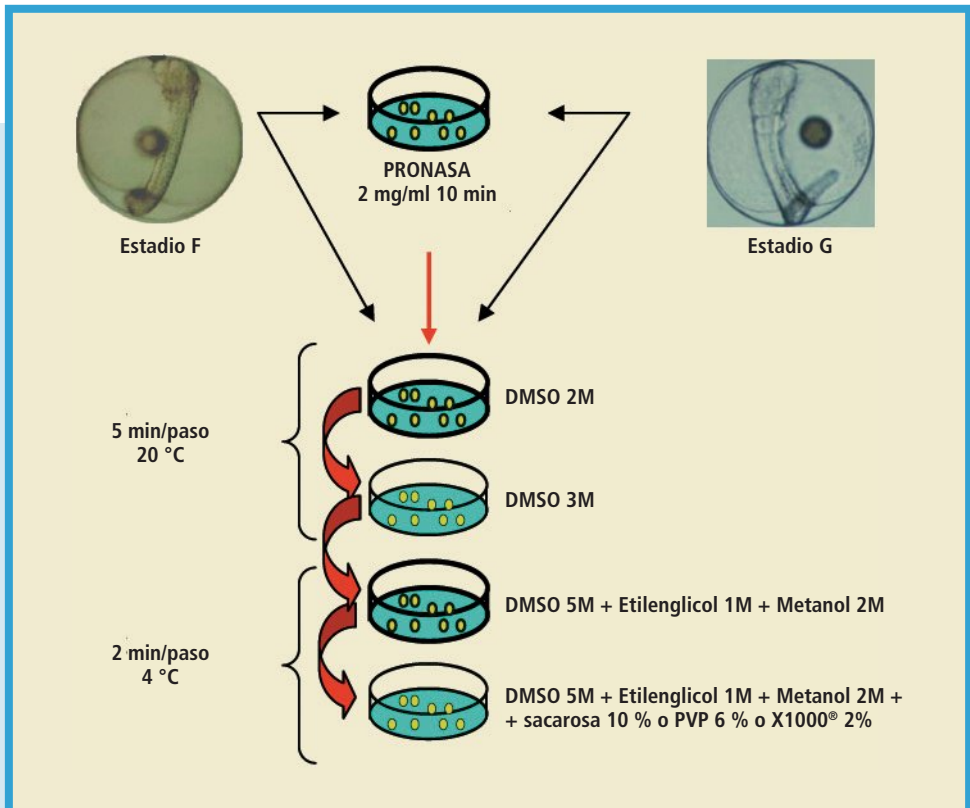


FIGURA 11.

Protocolo de incorporación de CPTs utilizado para la vitrificación de embriones de rodaballo.



como muestra la Figura 11 (Robles *et al.*, 2003). Estas soluciones han sido también utilizadas en otras especies (Robles *et al.*, 2005).

Una vez diseñadas estas soluciones hay que conseguir que penetren en todos los compartimentos del embrión en un tiempo breve para que no causen daños, y de nuevo nos encontramos con un problema: la permeabilidad de cada una de las envueltas es diferente. Se están dedicando muchos esfuerzos a analizar la entrada de los CPTs a cada compartimento del embrión. Estos agentes parecen entrar con facilidad al espacio perivitelino, el embrión parece tener una permeabilidad semejante a otros sistemas celulares, pero la permeabilidad del saco vitelino parece prácticamente nula (Hagedorn *et al.*, 1996; Cabrita *et al.*, 2003). Por eso, dentro del vitelo no se consiguen condiciones vitrificantes, y durante el proceso de vitrificación o la posterior descongelación, se observa la formación de cristales de hielo en su interior (Kopeika *et al.*, 2006; Robles *et al.*, 2005)

7.5.3. Permeabilización de embriones a los crioprotectores y al agua

La permeabilización o la eliminación de las distintas barreras parece ser imprescindible para conseguir una crioprotección eficaz en todo el embrión. Esto se ha intentado mediante tratamientos físicos, químicos y enzimáticos y últimamente, como se ha mencionado, mediante la expresión de canales de permeabilidad en las membranas celulares.

En algunos peces es relativamente sencillo eliminar el corion, la envuelta externa, mediante la digestión con la enzima pronasa, facilitando así el contacto más directo con el medio. En otros, como el rodaballo, esa opción no se ha conseguido ni mediante digestión con enzimas ni mediante tratamientos químicos (Robles *et al.*, 2007). Por lo que respecta a la permeabilización de la línea sincitial que rodea el vitelo, no parece que la expresión de aquaporinas haya conseguido por el momento avances que se reflejen en una mejor resistencia a la congelación, si bien es una línea muy prometedora.

En los últimos años se han realizado distintos intentos de introducción de CPTs mediante microinyección en el saco vitelino (Janik *et al.*, 2000; Kopeika *et al.*, 2006; Robles *et al.*, 2006). La microinyección es un proceso laborioso con el que se ha conseguido introducir los



CPTs en este compartimento, pero no su paso desde el vitelo hacia el compartimento celular. Además incrementa la resistencia a las bajas temperaturas, pero los daños causados por la propia punción en las envueltas, parecen tornar a los embriones más sensibles a los daños mecánicos que se producen posteriormente durante la vitrificación.

7.5.4. Resultados actuales y perspectivas de futuro.

Hasta la fecha nadie ha conseguido demostrar la obtención de embriones viables después de la congelación. En algunos casos se obtienen buenas morfologías embrionarias, pero los embriones no son capaces de proseguir el desarrollo. No obstante, el análisis de la actividad enzimática en embriones de rodaballo y pez cebra vitrificados y descongelados, demuestra que parte de las células del embrión (casi un 50 % de ellas en rodaballo) mantienen el contenido de enzimas citoplásmicas (una medida de la viabilidad celular) (Robles *et al.*, 2004). Sin embargo, los embriones tienen graves daños por insuficiente crioprotección, tanto en el compartimento celular como en el saco vitelino, que impiden su desarrollo.

Desde hace años se sabe que distintas especies de peces del Ártico, adaptados a la supervivencia en aguas por debajo de 0 °C, evitan la congelación produciendo pequeñas proteínas «anticongelación» (AFPs). Las AFPs deben su acción crioprotectora a que disminuyen la temperatura de congelación de los fluidos, reducen o suprimen la formación de cristales de hielo, inhiben la recristalización del hielo durante la descongelación y protegen a las membranas celulares (Fletcher *et al.*, 2001, Wang, 2000). Hasta el momento se han aislado y caracterizado 5 tipos de AFPs y se han realizado ensayos de su utilidad en distintos campos de la medicina o la biología (aumento de la resistencia a frío de las plaquetas, aumento de la calidad de alimentos congelados, incremento de la resistencia a las heladas de determinadas plantas o aumento de la tolerancia a aguas frías en los salmónidos). Se ha demostrado también su efecto beneficioso en la conservación de diferentes tejidos y órganos, así como de ovocitos o embriones de mamíferos (OíNeill *et al.*, 1998; Baguisi *et al.*, 1997). Los ensayos de criopreservación de embriones de solla roja, que expresa AFPs, demostraron su mayor resistencia a la criopreservación



(Robles et al, 2004), observándose incluso un pequeño porcentaje de embriones capaz de continuar el desarrollo tras la descongelación, si bien ninguno alcanzó la eclosión (Fig. 12). Posteriormente, trabajos realizados por Martínez-Páramo (Martínez-Páramo et al, 2008), demostraron que la introducción de AFPs en embriones de pez cebra mediante incubación en un medio con la proteína, proporcionaban una mayor resistencia al frío, así como una mejor respuesta a la criopreservación. Éste tratamiento incrementa el número de células embrionarias que son viables tras la descongelación y su capacidad de supervivencia en cultivo. Todos estos datos sugieren que la incorporación de AFPs en los embriones de peces, incrementaría su tolerancia a la congelación sin producir efectos perjudiciales. Por ello y debido al enorme potencial de estas proteínas, parece muy interesante desarrollar otras técnicas que permitan su utilización en combinación con los agentes CPTs clásicos.

Estos estudios permiten dar un giro en el diseño de estrategias de conservación, estudiando las soluciones que se acercan a las adoptadas por la naturaleza en condiciones de hipotermia. Probablemente estas estrategias habrán de combinarse con el uso de nuevos métodos de permeabilización a los CPTs clásicos (electroporación, sonicación, etc.), y probablemente con la expresión de aquaporinas, antes de conseguir resultados positivos. No obstante, el impulso que se está dando estos últimos años hace ser optimista, y prever que, en un plazo no muy largo, se obtengan algunos porcentajes de supervivencia, al menos en las especies más resistentes.

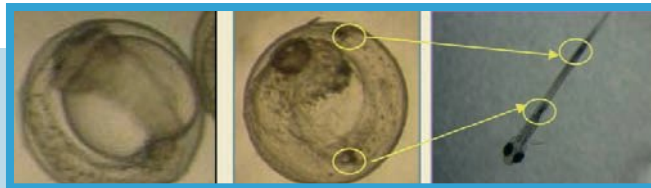


FIGURA 12.

Embrión de soja roja 1 día tras la descongelación (izda.) y 6 días tras la descongelación (centro). Se señala la aparición de las manchas pigmentarias típicas de las larvas (dcha.), que demuestran el avance del desarrollo embrionario.



7.6. CRIOPRESERVACIÓN DE BLASTÓMEROS Y CÉLULAS SOMÁTICAS

Una alternativa para la conservación del potencial genético de ambos progenitores es la congelación de blastómeros, es decir las primeras células embrionarias aisladas del embrión. Los blastómeros, aislados mediante procedimientos mecánicos y suaves tratamientos químicos y enzimáticos, pueden ser criopreservados con éxito. Leveroni y Maisse (1999) obtuvieron muy buenos porcentajes de supervivencia (96 % en células procedentes del estadio de blástula) y de funcionalidad celular tras la congelación/descongelación de blastómeros de carpa. Otros investigadores no han conseguido tan buenos resultados al estudiar otras especies (Strussmann et al, 1999), pero las características de los blastómeros son favorables para ser sometidos a procesos de congelación. La utilidad de estas células radica en la posibilidad de introducción de los blastómeros descongelados en otros embriones, en los primeros estadios de desarrollo. Una vez que las células son inyectadas en los embriones receptores, se incorporan a la masa celular, produciendo quimeras, o animales cuyas células proceden de dos embriones diferentes. Los cruces posteriores entre estas quimeras podían regenerar la población inicial. Estos ensayos se han realizado con éxito en trucha arco-iris y pez cebra (Strussmann et al., 1999). Lógicamente, este método no se contempla de momento como una alternativa a la conservación de embriones en acuicultura, pero sí puede ser muy interesante de cara a la conservación de determinadas líneas de peces de especial valor.

Otra alternativa para la conservación del genoma es la criopreservación de células somáticas de animales adultos. Para ello se utilizan habitualmente células procedentes de aletas, cuya capacidad de regeneración es bien conocida y que permitirían conservar el genoma de individuos independientemente de su madurez sexual. Estos procedimientos han permitido conservar la viabilidad del 50 % de las células procedentes de la aleta anal del carpín dorado (*Carassius auratus*) y podrían ser empleadas para recuperar los individuos o poblaciones mediante procesos de clonación, como los llevados a cabo por Ju et al. (2003) en medaka.



BIBLIOGRAFÍA

- ALAVI, S. M. H., and J. COSSON, 2006 Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell BioL Int* 30: 1-14.
- BABIAK, I., S. DOBOSZ, K. GORYCZKO, H. KUZMINSKI, P. BRZUZAN, and S. CIESIELSKI, 2002 Androgenesis in rainbow trout using cryopreserved spermatozoa: the effect of processing and biological factors. *Theriogenology* 57: 1229-1249.
- BABIAK, I., O. OTTESEN, G. RUDOLFSEN, and S. JOHNSEN, 2006 Chilled storage of semen from *Atlantic halibut*, *Hippoglossus hippoglossus* L.: I: Optimizing the protocol. *Theriogenology* 66: 2025-2035.
- BAGUISI, A., A. ARAV, T. F. CROSBY, J. F. ROCHE, and M. P. BOLAND, 1997 Hypothermic storage of sheep embryos with antifreeze proteins: Development in vitro and in vivo. *Theriogenology* 48: 1017-1024.
- BELLAGAMBA, F., S. CELORINI, and L. G. CAVALCHINI, 1993 Cryopreservation for poultry semen: a review. *Woods Poultry Science J.* 49: 158-166.
- BILLARD, B., and T. ZHANG, 2001 Techniques of genetic resource banking in fish, pp. 22-46 in *Cryobanking the genetic resources: wildlife conservation for the future?*, Taylor and Francis Books, edited by Watson P.F. and Holt W.V.. London.
- BLAXTER, J. H. S., 1953 Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature* 172: 1189-1190.
- CABRITA, E., R. ALVAREZ, L. ANEL, K. J. RANA, and M. P. HERRÁEZ, 1998 Sublethal damage during cryopreservation of rainbow trout sperm. *Cryobiology* 37: 245-253.
- CABRITA, E., R. ALVAREZ, E. ANEL, and M. P. HERRÁEZ, 1999 The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. *Anim Reprod Sci* 55: 279-287.
- CABRITA, E., V. ROBLES, R. ÁLVAREZ, and M. P. HERRÁEZ, 2001 Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture* 201: 301-314.
- CABRITA, E., V. ROBLES, O. CHEREGUINI, P. DE PAZ, L. ANEL, and M. P. HERRÁEZ, 2003 Dimethyl sulfoxide influx in turbot embryos exposed to a vitrification protocol. *Theriogenology* 60: 463-473.
- CABRITA, E., V. ROBLES, S. CUÑADO, J. C. WALLACE, C. SARASQUETE, and M. P. HERRÁEZ, 2005 Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5ml macrotubes. *Cryobiology* 50: 273-2.
- CHAMBEYRON, F., and Y. ZOHAR, 1990 A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 90: 345-352.



- CHAO, N. H. and I. C. LIAO, 2001 Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture* 197: 161-169.
- CIERESZKO, A., and K. DABROWSKI, 1995 Spectrophotometric measurement of aspartate aminotransferase activity in mammalian and fish semen. *Anim Reprod Sci* 38: 167-176.
- DREANNO, C., M. SUQUET, L. QUEMENER, J. COSSON, F. FIERVILLE, Y. NORMANT, and R. BILLARD, 1997 Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology* 48: 589-603.
- FAUVEL, C., M. SUQUET, C. DREANNO, V. ZONNO, and B. MENU, 1998 Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. *Aquat Living Resour* 11: 387-394.
- FLETCHER, G. L., C. L. HEW, and P. L. DAVIES, 2001 Antifreeze proteins of teleost fishes. *Annu Rev Physiol* 63: 359-390.
- FUNK, L., 2006 Major advances in globalization and consolidation of the artificial insemination industry. *J Dairy Science* 89: 1362-1368.
- GUAN, M., T. ZHANG, and D. M. RAWSON, 2006. Effects of improved controlled slow cooling protocols on the survival of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryobiology* 53: 377-378.
- GLOGOWSKI, J., I. BABIAK, K. GORYCZKO, and S. DOBOSZ, 1996 Activity of aspartate aminotransferase and acid phosphatase in cryopreserved trout sperm. *Reprod Fert Develop* 8: 1179-1184.
- GRUNINA, A. S., A. V. RECOUBRATSKY, L. I. TSVETKOVA, and V. A. BARMINTSEV, 2006 Investigation on dispermic androgenesis in sturgeon fish. The first successful production of androgenetic sturgeons with cryopreserved sperm. *Int J Refriger* 29: 379-386.
- HAGEDORN, M., E. W. HSU, U. PILATUS, D. E. WILDT, W. F. RALL, and S. J. BLACKBAND, 1996 Magnetic resonance microscopy and spectroscopy reveal kinetics of cryoprotectant permeation in a multicompartamental biological system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 7454-7459.
- HAGEDORN, M., F. W. KLEINHANS, D. ARTEMOV, and U. PILATUS, 1998 Characterization of a major permeability barrier in the zebrafish embryo. *Biol Reprod* 59: 1240-1250.
- HAGEDORN, M., and F. W. KLEINHANS, 2000 Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos, pp. 161-178 in *Cryopreservation in Aquatic Species*, edited by T. R. Tiersch and P. M. Mazik. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.
- HAGEDORN, M., A. PETERSON, P. MAZUR, and F. W. KLEINHANS, 2004 High ice nucleation temperature of zebrafish embryos: slow-freezing is not an option. *Cryobiology* 49: 181-189.



- HERRÁEZ, M.P., S. PÉREZ-CEREZALES, S. MARTÍNEZ-PÁRAMO, E. CABRITA, L. ANEL, and F. MARTÍNEZ-PASTOR, 2006 Chromatin stability during short and long-term storage of sex-reversed rainbow trout sperm. World Aquaculture Society Meeting, Aquaculture Florencia, 9-13 Mayo 2006.
- JANIK, M., F. W. KLAINHANS, and M. HAGEDORN, 2000 Overcoming a permeability barrier by microinjection of cryoprotectants into zebrafish embryos (*Brachydanio rerio*). Cryobiology 41: 25-34.
- KOPEIKA, J., T. ZHANG, and D. RAWSON, 2006 Zebrafish embryos (*Danio rerio*) using microinjection. Cryoletters 27: 319-328.
- LAHNSTEINER, F., T. WEISMANN, and R. A. PATZNER, 1995 A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta fario*, *Salmo trutta lacustris*, *Coregonus* sp. Aquac Res 26: 801-807.
- LAHNSTEINER, F., T. WEISMANN, and R. PATZNER, 1996 Cryopreservation of semen of the grayling (*Thymallus thymallus*) and the Danube salmon (*Hucho hucho*). Aquaculture 144: 265-274.
- LAHNSTEINER, F., B. BERGER, A. HORVATH, B. URBANYI, and T. WEISMANN, 2000 Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. Theriogenology 54: 1477-1498.
- LAHNSTEINER, F., B. BERGER, and T. WEISMANN, 2003 Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. Theriogenology 60: 829-841.
- LAHNSTEINER, F., 2007 Characterization of seminal plasma proteins stabilizing the sperm viability in rainbow trout (*O. mykiss*). Anim Reprod Sci 97: 151-164.
- LEIBO, S. P., and N. SONGSASEN, 2002 Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. Theriogenology 57: 303-326.
- LEVERONI, S., and G. MAISSE, 1999 Cryopreservation of carp (*Cyprinus carpio*) blastomeres. Aquat Living Resour 12: 71-74.
- MAISSE, G., 1996 Cryopreservation of fish semen: a review, pp. 443-467 in Refrigeration and Aquaculture Conference. Bordeaux, 20-22/03/96.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., S. PÉREZ-CEREZALES, V. ROBLES, L. ANEL, and M. P. HERRÁEZ, 2008 Incorporation of antifreeze proteins into zebrafish embryos by a non-invasive method. Cryobiology in press.
- MAZUR, P., 1984 Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am. J. Physiol. 247: 125-147.
- OGIER DE BAULNY, B., Y. LE VERN, D. KERBOEUF, and G. MAISSE, 1997 Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrana integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout spermatozoa. Cryobiology 34: 141-149.
- O'NEILL, L., B. J. PAYNTER, R. W. FULLER, S. J. SHAW, DeVRIES, 1998 Vitrification of mature mouse oocytes in a Me2SO solution supplemented with antifreeze glycoproteins: de effect of temperature. Cryobiology. 37: 59-66.



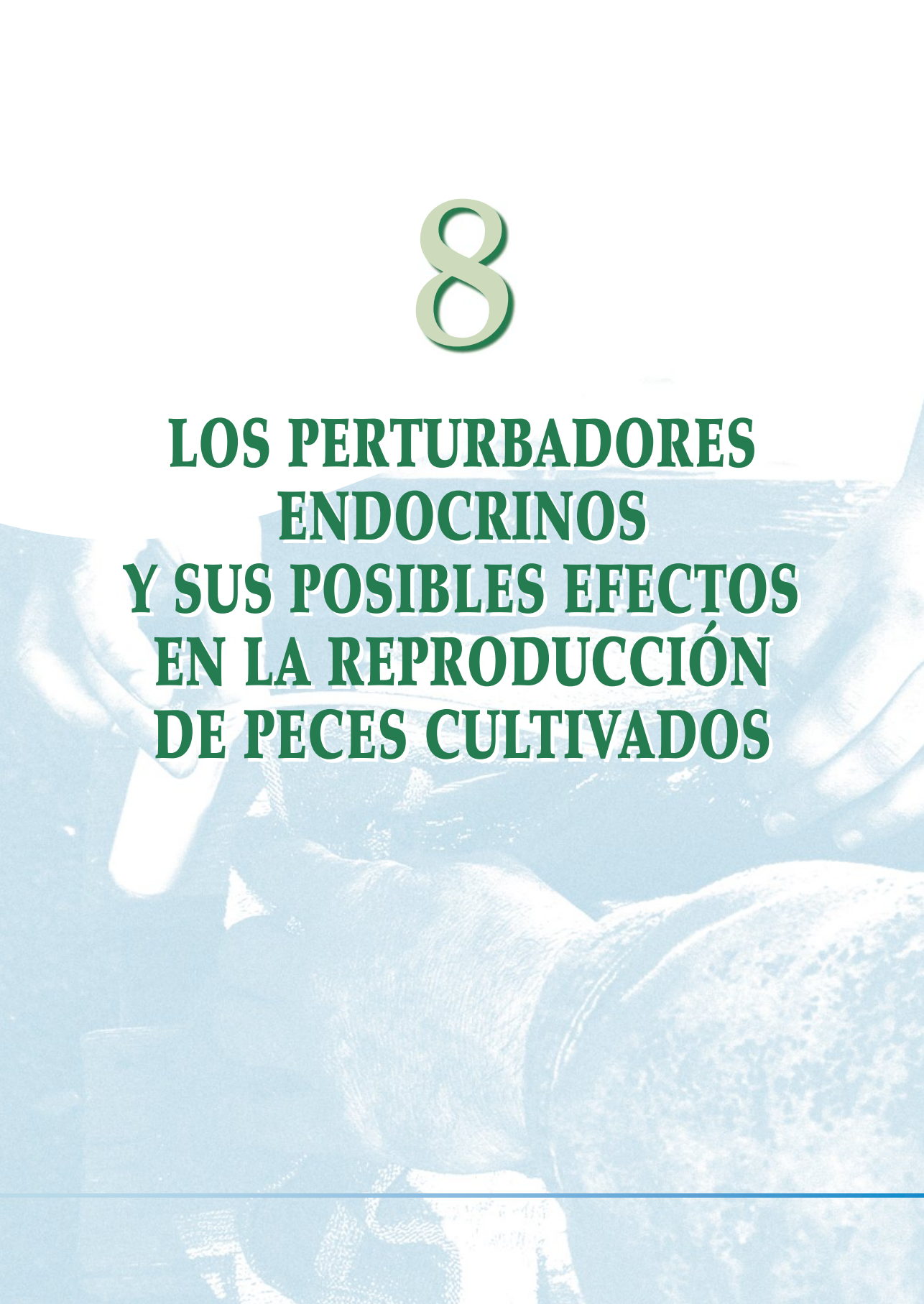
- OSTERGAARD, S., M. M. HANSEN, V. LOESCHKE, and E. E. I. NIELSAEN, 2003 Long-term temporal changes of genetic composition in brown trout (*Salmo trutta* L.) populations inhabiting an unstable environment. *Mol Ecol.* 12: 3123-35.
- PARKS, J. E., and J. K. GRAHAM, 1992 Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.
- POLGE, C., A. U. SMITH, and A. S. PARKES, 1949 Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.
- RALL, W.F., 1992 Advances in the cryopreservation of embryos and prospects for the application to the conservation of salmonid fishes, in *Genetic conservation of salmonid fishes*, edited by Cloud and Thorgaard. Plenum Press, New York.
- RALL, W.F., 1993 Recent advances in the cryopreservation of salmonid fishes, pp. 137-158 in *Genetic Conservation of Salmonid Fishes*, edited by J. G. Cloud, and G. H. Thorgaard. Plenum, New York.
- RANA, K.J., R. M. MUIRURI, B. J. McANDREW, and A. GILMOUR, 1990 The influence of diluents, equilibration time and prefreezing storage time on the viability of cryopreserved *O. niloticus* spermatozoa. *Aquaculture and Fisheries Management* 20: 25-30.
- RANA, K. J., 1995 Preservation of gametes, pp. 53-75 in *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*, edited by N. Bromage and R. J. Roberts. Iowa State Press, Blackwell, London.
- RIABOVA, G. D., V. O. KLIMONOV, and G. A. RUBTSOVA, 2006 Variation in morphometric and genetic characteristics of stellate sturgeon juveniles raised at different densities. *Genetika* 42: 244-255.
- ROBLES, V., CABRITA, E., CUÑADO, S., and HERRÁEZ, M. P., 2003 Sperm cryopreservation of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): parameters that affect its ability for freezing. *Aquaculture* 224: 203-212.
- ROBLES, V., E., CABRITA, P. DE PAZ, S. CUÑADO, L. ANEL, and M. P. HERRÁEZ, 2004 Effect of a vitrification protocol on the lactate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities and the hatching rates of Zebrafish (*Danio rerio*) and Turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos. *Theriogenology* 61: 1367-1379.
- ROBLES, V., E., CABRITA, G. L. FLETCHER, M. A. SHEARS, M. J. KING, and M. P. HERRÁEZ, 2005 Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. *Theriogenology* 64: 1633-1643.
- ROBLES, V., E. CABRITA, L. ANEL, and M. P. HERRÁEZ, 2006 Microinjection of the antifreeze protein type III (AFPIII) in turbot (*Scophthalmus maximus*) embryos: Toxicity and protein distribution. *Aquaculture* 261: 1299-1306.



- ROBLES, V., E. CABRITA, P. DE PAZ, and M. P. HERRÁEZ, 2007 Studies on chorion hardening inhibition and dechorionization in turbot embryos. *Aquaculture* 262: 535-540.
- ROLDAN, E. R. S., and J. J. GARDE, 2004 Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción, pp. 283-307 in *Los Retos Medio-ambientales del siglo XXI. La Conservación de la Biodiversidad en España*, edited by M. Gomendio. Fundación BBVA, Bilbao.
- RURANGWAA, E., D. E. KIMBE, F. OLLEVERIA, and J. P. NASHA, 2004 The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234: 1-28.
- SCOTT, A. P., and S. M. BAUNES, 1980 A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Fish. Biol.* 17: 707-739.
- SPALLANZANI, L., 1776 *Opuscoli di fisica animale e vetetebile*. Vols2, opuscolo II. Modena Presso La Socita Tipographica
- STOSS, J., and W. HOLTZ, 1983 Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. III. Effect of proteins in the diluent, sperm from different males and interval between sperm collection and greezing. *Aquaculture*. 31: 275-282.
- STRÜSSMANN, C. A., H. NAKATSUGAWA, F. TAKASHIMA, M. HASOBE, T. SUZUKI, and R. TAKAI, 1999 Cryopreservation of Isolated Fish Blastomeres: Effects of Cell Stage, Cryoprotectant Concentration, and Cooling Rate on Postthawing Survival. *Cryobiology* 39: 252-261.
- SUQUET, M., C. DREANNO, B. PETTON, Y. NORMANT, M. H. OMNES, and R. BILLARD, 1998 Long-term effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. *Aquat Living Resour* 11: 45-48.
- TROUNSEN, A., and L. MOHR, 1983 Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 305: 707.
- VAJTA, G., and M. KUWAYAMA, 2006 Improving cryopreservation systems *Theriogenology*, 65: 236-244.
- WANG, J.H., 2000 A Comprehensive Evaluation of the Effects and Mechanisms of Antifreeze Proteins during Low-Temperature Preservation. *Cryobiology* 41: 1-9.
- WATSON, P. F., and B. J. FULLER, 2001 Principles of cryopreservation of gametes and embryos, pp. 22-46 in *Cryobanking the genetic resource*, edited by P. F. Watson and W. V. Holt. Taylor and Francis Books, London.
- WATSON, P., and W. V. HOLT., 2001 Cryobanking the genetic resources: wildlife conservation for the future?, pp. 480, edited by Watson and Holt Taylor and Francis, London.
- WHITTINGHAM, D. G., S.P. LEIBO, and P. MAZUR, 1972 Survival of mouse embryos frozen to -196 °C to -296 °C. *Science* 178: 411-414.
- WILMUT, I., and I. E. A. ROWSON, 1973 Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92: 686-690.

8

LOS PERTURBADORES ENDOCRINOS Y SUS POSIBLES EFECTOS EN LA REPRODUCCIÓN DE PECES CULTIVADOS





LOS PERTURBADORES ENDOCRINOS Y SUS POSIBLES EFECTOS EN LA REPRODUCCIÓN DE PECES CULTIVADOS

José María Navas

Instituto Nacional de Investigación
y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)

Resumen

Existe una gran cantidad de productos químicos que son capaces de interaccionar con el sistema endocrino de los animales provocando desarreglos en su funcionamiento, lo que se conoce como perturbación endocrina o disrupción endocrina (del inglés «endocrine disruption»). Este tipo de procesos alcanza importancia a nivel ecológico cuando compromete la eficacia reproductora de los individuos, de modo que pueda peligrar la continuidad de las poblaciones. Potencialmente cualquier sistema hormonal es susceptible de sufrir perturbaciones causadas por algunos productos químicos, pero los trabajos científicos han profundizado en particular en las alteraciones que afectan a los procesos regulados por los estrógenos, debido al papel fundamental que juegan estas hormonas en la regulación de la reproducción. En el caso de los peces, la vitelogenénesis (es decir, la producción de la vitelogenina que originará las reservas del futuro huevo) está influenciada por prácticamente cualquier proceso hormonal que tenga lugar en el organismo, de modo que la perturbación de cualquiera de estos procesos hormonales por productos químicos puede llegar a afectar a la eficacia reproductora. Diversos tipos de compuestos químicos pueden actuar como perturbadores endocrinos siguiendo diferentes mecanismos. Si estas sustancias llegan a los peces en cultivo podrían originar problemas de importancia.



Abstract

An important number of chemicals are able to interact with animal endocrine systems altering their normal functioning and leading to what it has been called endocrine disruption. These phenomena could provoke a reduction in reproductive performance compromising, in the worst case, the continuity of animal populations. Although any hormone system is susceptible to be affected by endocrine disruption, estrogens have been the subject of a variety of scientific studies due to the important role played by these hormones in the regulation of reproduction. In fish, the process of vitellogenesis (i.e. the production of vitellogenin that will originate the yolk reserves of the future egg) is influenced by almost any hormonal process, so that disruption of these hormonal processes can alter the normal production of vitellogenin and reduce reproductive performance. A variety of chemical groups can act as endocrine disruptors by different mechanisms and can originate important problems when reaching fish in farms.

8.1. INTRODUCCIÓN Y CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA PERTURBACIÓN («DISRUPCIÓN») ENDOCRINA

Una gran variedad de compuestos, tanto resultantes de la actividad humana como producidos por la naturaleza, son capaces de interaccionar con los sistemas endocrinos animales a través de diferentes mecanismos (Colborn y Clement, 1992; Kavlock et al., 1996). Estas sustancias pueden imitar o inhibir la acción de diversas hormonas en sus tejidos diana interaccionando directamente con los receptores adecuados, pueden alterar la cascada de reacciones celulares desencadenadas por esas hormonas, incluso provocar modificaciones en la disponibilidad de las proteínas transportadoras o causar cambios en el funcionamiento de los sistemas enzimáticos encargados de sintetizar y catabolizar las hormonas dando lugar a niveles anormales en sangre.

El resultado de todos estos procesos es finalmente una perturbación (reversible o irreversible) de la homeostasis corporal que puede dar lugar a un retardo del crecimiento, a un desarrollo sexual inadecuado o a una disminución de la eficacia reproductora, no sólo por un efecto



directo sobre la fisiología del proceso reproductor sino, en ocasiones, también por una alteración del comportamiento reproductivo que provoca, particularmente en aquellas especies en las que se dan ciertos juegos de «galanteo», un descenso de reclutamiento. Evidentemente, en lo que respecta al ser humano cualquier alteración que pueda afectar a la salud del individuo ha de ser tomada en cuenta, pero en ecotoxicología se toman en consideración aquellos efectos que tengan una repercusión a nivel poblacional, lo que se traduce en que estén impidiendo la reproducción normal de un número de individuos suficientemente elevado. Por lo tanto, la importancia real de cualquier fenómeno que esté alterando los procesos endocrinos de un organismo depende de la capacidad que tenga ese fenómeno de provocar una disminución en la eficacia reproductora de un individuo y, por ende, de una población.

Evidentemente, cualquier sistema hormonal puede verse afectado por este tipo de fenómenos a los que nos estamos refiriendo, pero la interferencia de estos compuestos químicos con los estrógenos ha llamado especialmente la atención y ha sido muy estudiada debido al papel fundamental que juegan estas hormonas en la regulación del proceso reproductor. Existen también referencias a modificaciones en el funcionamiento de otras hormonas como los andrógenos, las hormonas tiroideas o las hormonas hipofisarias, pero la mayor parte de los estudios que se van a citar están relacionados con las hormonas estrogénicas.

Dado que esta obra se escribe en castellano conviene hacer algunos comentarios sobre la terminología más adecuada a utilizar. Hasta ahora en este texto se ha venido citando la palabra «perturbación», en lugar del término tan extendido de «disrupción». Este último no aparece en el Diccionario de la Real Academia Española de la Lengua, en cuya elaboración han participado las academias de la lengua española de todos los países en los que el español es oficial o alcanza una importancia de uso relevante. «Disrupción endocrina» es una adaptación del inglés «endocrine disruption» y en castellano se utiliza, al menos en el ámbito científico, exclusivamente para hacer referencia a estas perturbaciones endocrinas a las que nos hemos estado refiriendo, de modo que se ha convertido en un término que denomina con exactitud un



proceso concreto, por lo que no se puede descartar su utilización en esta obra. Pero se combinará con «perturbación endocrina» que, en castellano, abarca perfectamente todos los fenómenos que van a ser tratados. Por otro lado, aquellos productos químicos causantes de estos fenómenos van a ser llamados perturbadores endocrinos o disruptores endocrinos, (DEs, adaptando al castellano el inglés «endocrine disruptors» o «endocrine disrupters»).

Conviene indicar que aunque existe una gran cantidad de datos acerca de perturbaciones endocrinas causadas por sustancias químicas en peces, sin embargo esa información se ha obtenido en poblaciones salvajes o en peces mantenidos en laboratorio y expuestos a los productos estudiados, de manera que los estudios sobre la aparición de este fenómeno en piscicultura son realmente escasos. Esta situación se puede considerar paradójica cuando se cae en la cuenta de que la piscicultura ha sido pionera en la «manipulación hormonal» con vistas al control de las proporciones de sexos en las poblaciones cultivadas (ver, por ejemplo, la revisión de Piferrer, 2001). De hecho, los estudios iniciales así como aquellos con más impacto sobre disrupción endocrina en peces han sido realizados en laboratorios originalmente dedicados al estudio de la fisiología de la reproducción de peces con una clara aplicación en acuicultura. En cualquier caso, la escasez de estudios sobre este tema en piscicultura quizás refleje una falta de incidencia real de procesos de perturbación endocrina en los peces cultivados. No obstante, con vistas al reconocimiento y prevención de estos procesos es importante conocer tanto las alteraciones fisiológicas que subyacen en el fenómeno de la disrupción endocrina, como los mecanismos moleculares por los que actúan los diferentes disruptores endocrinos. Teniendo en cuenta esto, se va a intentar dar unas notas generales sobre el fenómeno de la disrupción endocrina en peces para después pasar a discutir la posible incidencia de la disrupción endocrina en las explotaciones acuícolas.

La importancia para la piscicultura de los compuestos que se citarán como DEs radica no solo en el hecho de que estos compuestos puedan llegar a interferir con el proceso reproductor o con el desarrollo y crecimiento de los peces mantenidos en cultivo, con las posibles pérdidas económicas que ello conlleva, sino también en que estos compuestos



podrían llegar a través de la carne del pescado cultivado hasta las personas con el consiguiente riesgo para la salud. Por ello, al hablar de los diferentes compuestos que puedan actuar como disruptores endocrinos no sólo se van a dar algunas notas acerca de su posible actividad en peces, sino que también se van a comentar, de un modo general, los posibles riesgos identificados en esos compuestos para la salud humana.

8.2. ALGUNOS PROCESOS QUE SE PUEDEN VER PERTURBADOS POR LA ACCIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS

Hay que incidir al inicio de este apartado en que prácticamente cualquier hormona puede verse afectada en su mecanismo de acción por los procesos de disrupción endocrina. Sin embargo, no es viable hacer un retrato detallado de todo el sistema endocrino de los peces indicando cada uno de los procesos que se pueden ver afectados y los mecanismos por los que se produce la alteración. Esta sección del presente capítulo se va a centrar en los estrógenos, dado que la mayor parte de los procesos de disrupción endocrina referenciados afectan, directa o indirectamente, al funcionamiento de estas hormonas. Además, tal y como se ha dicho anteriormente, la importancia de la disrupción endocrina viene dada por la disminución que se produzca en la eficacia reproductora del individuo y, puesto que los estrógenos tienen un papel central en la regulación del proceso reproductor, en muchas ocasiones la importancia de un proceso de disrupción endocrina depende de las alteraciones que se produzcan en el funcionamiento normal de los estrógenos. También conviene hacer notar que va a haber importantes variaciones interespecíficas, por lo que no queda más remedio que realizar generalizaciones, que, por otro lado, han de ser tomadas con las debidas reservas.

8.2.1. Mecanismo de acción de los estrógenos

Los estrógenos, se producen en las células foliculares y desde allí salen a la corriente sanguínea para llegar a sus células diana. La formación de estrógenos se ha atribuido a las células de la granulosa en



una serie de especies, pero de acuerdo con Hoar y Nagahama (1978) los estrógenos se sintetizan principalmente en una serie de células de la teca. Normalmente se ha admitido que entran en estas células por difusión simple aunque se ha observado que el 17 β -estradiol (E2) es capaz de interactuar con algunos receptores de membrana (Nadal *et al.*, 2000), interacción que también es susceptible de sufrir perturbaciones causadas por sustancias estrogénicas. Una vez en el interior de la célula el efecto del E2 o de otros estrógenos es mediado por un receptor específico, el receptor de estrógenos (ER). Se trata de una proteína que pertenece a una superfamilia de receptores nucleares, la de los receptores esteroideos/tiroideos, que actúan como receptores y como factores de transcripción (Carson-Jurica *et al.*, 1990; Tsai y O'Malley, 1994). En otros capítulos de este libro se han hecho descripciones detalladas sobre el receptor de estrógenos. Baste aquí decir que en ausencia de un ligando el ER se encuentra asociado a una proteína de choque térmico («heat shock protein», hsp) formando un complejo oligomérico incapaz de interactuar con el DNA (Chambraud *et al.*, 1990). Tras la unión a la hormona, ese complejo se disocia y el receptor sufre una dimerización, formándose un homodímero activo que es capaz de reconocer y asociarse con secuencias palindrómicas de DNA denominadas «estrogen responsive elements» (ERE) (Tsai y O'Malley, 1994). El resultado final es una modificación en la actividad transcripcional de los genes estrógeno dependientes.

8.2.2. Producción de vitelogenina

Uno de los genes inducibles por los estrógenos es el de la vitelogenina (VTG). Se trata de una glucolipofosfoproteína que se produce en el hígado de los animales ovíparos. Desde el hígado la VTG es liberada a la corriente sanguínea a través de la cual llega hasta los oocitos en formación donde se internaliza a través de receptores específicos de membrana en un proceso de endocitosis (Wallace y Selman, 1990). En el interior del oocito la VTG sufre una serie de transformaciones y acaba formando el vitelo, que constituye las reservas del futuro huevo (Mommsen y Walsh, 1988; Specker y Sullivan, 1994).

La vitelogénesis (proceso de producción de VTG) es un periodo crucial en el ciclo reproductor de la hembra y los niveles plasmáticos



de VTG son un indicador directo del estadio reproductivo en que se encuentra. Los niveles máximos de VTG detectados en el plasma de hembras maduras varían enormemente de unas especies a otras: sus valores pueden ir desde 0.1 mg/ml en *Pimephales promelas* (Tyler *et al.*, 1999), 1 mg/ml en *Morone saxatilis* (Tao *et al.*, 1993) o en *Rutilus rutilus* (Tyler *et al.*, 1996), 8 mg/ml en lubina, *Dicentrarchus labrax* (Navas *et al.*, 1998), hasta cerca de 60 mg/ml en trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* (Bon *et al.*, 1997).

La VTG, por lo tanto, puede alcanzar, bajo la estimulación adecuada, unas concentraciones plasmáticas muy altas y fácilmente detectables, lo que la convierte en un biomarcador ideal de procesos estrogénicos: si normalmente la VTG sólo debería de aparecer en hembras en vitelogénesis, tras la exposición a sustancias estrogénicas la VTG puede encontrarse en el plasma de inmaduros o de machos.

8.2.3. Regulación de la producción y liberación de gonadotropinas

Los estrógenos también juegan un papel muy importante en la regulación de la producción y liberación de las gonadotropinas hipofisarias, la hormona luteinizante (LH) y la folículo estimulante (FSH). Aunque existen matices que diferencian las funciones desempeñadas por estas hormonas en distintas especies se acepta en general que la FSH actúa primordialmente durante el proceso de vitelogénesis estimulando la producción de esteroides sexuales y la incorporación de vitelogenina al interior del oocito (Tyler *et al.*, 1991). La LH, por su parte, regularía el proceso final de maduración y de puesta (revisado por Swanson, 1991). No obstante siempre hay excepciones: por ejemplo en el folículo ovárico de *Pagrus major* es la LH, pero no la FSH, la que estimula la producción de E2 (Kagawa *et al.*, 2003). En salmónidos la FSH aumenta sus niveles plasmáticos durante los procesos de vitelogénesis y oogénesis en hembras y de espermatogénesis en machos mientras que la LH aparece en ambos sexos únicamente cuando el momento de la maduración de los gametos y la puesta se acercan (Swanson *et al.*, 1991; Sumpter y Scott, 1989). Un patrón parecido se observa en otras especies. Por ejemplo en la lubina, la concentración de LH aumenta durante el tiempo de puesta y alcanza los máximos



niveles aproximadamente en el punto medio de ese periodo de puesta (Navas *et al.*, 1998).

La liberación de LH desde la hipófisis es regulada por la acción conjunta de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y por el denominado factor inhibidor de la liberación de gonadotropinas («gonadotropin release-inhibitory factor», GRIF) (Revisado por Peter y Yu, 1997). Este GRIF ha sido identificado como la dopamina en varias especies de peces (De Leeuw *et al.*, 1986; Lin *et al.*, 1989).

Una serie de estudios en salmónidos inmaduros (Crim y Evans, 1983) y en anguila europea (Dufour *et al.*, 1983) evidenciaron que el E2 era capaz de estimular la producción y acumulación de LH en la hipófisis, pero no su liberación (Revisado por Peter y Yu, 1997). En una serie de experimentos realizados en carpín (*Carassius auratus*, Trudeau *et al.*, 1993) se observó que los esteroides sexuales aumentaban la secreción de LH potenciando la respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), sin afectar la secreción basal de LH. En otros estudios más recientes se ha observado la capacidad que tiene el E2 de disparar la liberación de LH actuando sobre la producción de GnRH en el hipotálamo y facilitando su acción a nivel de la hipófisis, por ejemplo en la especie *Acanthopargus schlegeli* (Yen *et al.*, 2002). También en la lubina se observó que niveles elevados de E2 durante el periodo de puesta estaban asociados a unas concentraciones mayores de LH, lo que se relacionó con el papel estimulante del E2 en la secreción de LH (Navas *et al.*, 1998).

8.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PERTURBADORES ENDOCRINOS

8.3.1. Procesos de estrogenicidad

Los efectos fisiológicos causados por el E2 y otros estrógenos se denominan estrogénicos, y aquellos productos químicos, naturales o producto de la actividad humana, que son capaces de imitar la acción de los estrógenos en sus células diana se consideran sustancias estrogénicas. Según este planteamiento y desde una visión reducida a su mecanismo de acción a nivel molecular las únicas sustancias estrogénicas serían aquellas capaces de interaccionar con el ER, o con



otros receptores a los que los estrógenos también puedan unirse, (de acuerdo con Nadal *et al.*, 2000) y de provocar la misma cascada de reacciones que el E2.

Sin embargo, también se podría hablar de sustancias estrogénicas, en un sentido más amplio, al referirnos a compuestos capaces de aumentar la tasa de actividad de los enzimas que intervienen en el proceso de síntesis del E2 y que por lo tanto darían lugar a un aumento de los niveles de esta hormona.

Hay que tener también en cuenta que, aunque la producción de VTG se utiliza habitualmente como marcador de estrogenicidad, las sustancias estrogénicas no sólo actúan en el hígado provocando la inducción de VTG sino que pueden actuar sobre el ER que se esté expresando en cualquier célula de un organismo siempre que sean capaces de alcanzar esa célula. Así, por ejemplo, podrían interaccionar con el ER que se expresa en ciertas neuronas del hipotálamo de los peces que muestran conexión con otras neuronas en las que se produce GnRH (Navas *et al.*, 1995), o podrían interaccionar directamente con las células hipofisarias en las que se produce el ER. Puesto que los estrógenos intervienen a través de mecanismos de retroalimentación en la regulación de la producción y liberación de hormonas hipofisarias (Peter 1983; Kah, 1986; Trudeau *et al.*, 1993), al final las sustancias estrogénicas pueden influir en la regulación de la secreción de estas hormonas.

8.3.2. Procesos de antiestrogenicidad

Aunque existe una tendencia muy marcada a asociar los procesos de disrupción endocrina con fenómenos de estrogenicidad, sin embargo, la realidad es que en muchas ocasiones, se está haciendo referencia a antiestrogenicidad. De hecho muchos de los contaminantes ampliamente extendidos en el medio ambiente y en la biota a lo largo de toda la cadena trófica como las policlorodibenzo-*p*-dioxinas (nos vamos a referir a ellas simplemente como dioxinas) tienen, predominantemente, un efecto antiestrogénico (Safe, 1994), aunque algunos congéneres o mezcla de congéneres puedan ser estrogénicos. La razón de esta contradicción puede radicar en cierta simplificación del fenómeno que tiende a obviar mecanismos complejos que implican interacción entre varios receptores y que desemboca en un fenómeno de antiestrogenicidad, o también en



el hecho de que ciertas observaciones que son especialmente evidentes y llamativas para la opinión pública, como el desarrollo de oocitos en el interior de testículos (hay que reconocer que para un reportero es tentador basar su noticia en la aparición de «hermafroditas» o de «machos feminizados»), hagan que otros procesos más complejos, pero igualmente importantes, queden relegados a un segundo plano.

En los procesos de antiestrogenicidad una determinada sustancia (antiestrógeno) tiene una acción antagonica a la de los estrógenos en sus células diana (ver revisión de Navas y Segner, 1998). Estos compuestos antiestrogénicos pueden interferir con la acción de los estrógenos a diferentes niveles a través de mecanismos dependientes o independientes del ER. Existen antiestrógenos que actúan como antagonistas o como agonistas parciales del ER, de modo que aunque se unen al ER no llegan a activarlo, pero lo bloquean. Un antiestrógeno de este tipo es el tamoxifeno. Cuando el E2 se une al receptor, el complejo resultante activa la transcripción de genes a través de dos lugares específicos en la proteína del receptor: una región activadora N-terminal (AF1) que es estrógeno independiente, y una región activadora en el dominio de unión al estrógeno (AF2) que sí que es estrógeno dependiente (Pakdel y Katzenellenbogen, 1992; Tsai y O'Malley, 1994). La unión del tamoxifeno al ER provoca la activación del dominio AF1 (independiente de los estrógenos), pero no del dominio AF2 (dependiente de los estrógenos). El complejo tamoxifeno-receptor es capaz de interactuar con el DNA, pero como la región AF2 permanece sin modificaciones, no se produce la activación de la transcripción del gen (Tzukerman *et al.*, 1994). Sólo se produce una mínima inducción debida a la actividad constitutiva del dominio AF1 (actividad agonista parcial).

Además de los antiestrógenos que interactúan con el ER existe otro grupo de sustancias que actúan a través del receptor de hidrocarburos aromáticos («aryl hydrocarbon receptor», AhR). Este receptor, de naturaleza proteica muestra un comportamiento similar al de otros receptores nucleares pero su ligando natural no se conoce (ver la revisión de Rowlands y Gustafson, 1997). Sin embargo algunos xenobióticos (sustancias extrañas a los organismos vivos), como las dioxinas y compuestos relacionados [furanos policlorados (PCDFs), algunos bifenilos policlorados (PCBs), e hidrocarburos poliaromáticos (PAHs)]. (Para detalles sobre



su estructura mirar más adelante) son ligandos del AhR (Safe, 1995). Cuando un ligando se une al AhR el complejo inactivo experimenta la pérdida de dos proteínas, una proteína 90 de choque térmico («heat shock protein 90», hsp90) y una proteína de 43 K-Da (p43), y se transfiere hasta el núcleo donde forma un heterodímero con la proteína nuclear traslocadora del AhR («AhR nuclear translocator protein», Arnt). La interacción de este heterodímero con elementos de respuesta a dioxinas (DRE) en el DNA provoca la expresión de genes dependientes del AhR. Uno de estos genes es el del citocromo P4501A (CYP1A), cuya expresión puede evidenciarse midiendo las actividades enzimáticas asociadas a él. Una de ellas es la actividad etoxiresorufina-O-deetilasa (EROD).

Desde hace tiempo se han ido acumulando pruebas de que la activación del AhR subyace al efecto antiestrogénico causado por dioxinas y compuestos relacionados (Safe, 1995). Por un lado, dioxinas y compuestos relacionados son capaces de bloquear la acción de sustancias estrogénicas in vitro (por ejemplo bloqueando la proliferación estrógeno-dependiente de la línea celular MCF7, Krishnan y Safe, 1993), y la potencia de esta actividad antiestrogénica está directamente relacionada con la potencia de estos compuestos a la hora de inducir respuestas mediadas por el AhR, como la inducción del CYP1A. Por otro lado, estos compuestos no son capaces de unirse al ER, por lo tanto si afectan a los procesos regulados por este receptor han de actuar a través de mecanismos diferentes de la unión ligando-receptor (DeVito *et al.*, 1992). Además, cuando se bloquea el AhR mediante el uso de un antagonista, como la α -naftoflavona (α NF), también se bloquea el efecto antiestrogénico de las dioxinas y compuestos relacionados (Merchant *et al.*, 1993).

La antiestrogenicidad de estos compuestos y las líneas de evidencia citadas también se han observado en peces. Así, en una serie de experimentos realizados utilizando hepatocitos primarios de trucha arco iris (Navas y Segner, 2000) se mostró que algunos PAHs eran capaces de provocar un efecto antiestrogénico al bloquear la producción de VTG estimulada por E2. Además, el efecto antiestrogénico era tanto más marcado cuanto mayor era la potencia de inducción de la actividad EROD de estos compuestos. Cuando a los cultivos se añadieron los bloqueantes del AhR, α NF u 8-metoxipsoraleno, la inducción de la acti-



vidad EROD se vio bloqueada, pero también su efecto antiestrogénico, de modo que se recuperó la producción de VTG estimulada por el E2.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar este proceso de antiestrogenicidad mediado por el AhR (ver revisión de Navas y Segner, 1998). Una opción es que se produzca un aumento del metabolismo del E2 en las células debido a la inducción de la actividad enzimática del CYP1A. Sin embargo, Safe (1995) señala que la antiestrogenicidad se produce a concentraciones muy bajas de compuesto, a las que la inducción del CYP1A es mínima y, además, se producen tan rápidamente que es difícil que la actividad del CYP1A esté involucrada en este proceso (Safe, 1995). Otra opción es que el AhR interfiera con el ER a nivel génico: se han identificado DRE insertos en genes estrógeno-dependientes (Zacharewski *et al.*, 1994). Al interaccionar con estas secuencias el AhR activado estaría impidiendo la transcripción normal de estos genes (Safe, 1995). Una opción muy interesante, descrita por Ohtake *et al.* (2003) en una serie de experimentos en líneas celulares y en ratón es que el AhR activado pueda interaccionar con el ER, de modo que el complejo resultante no es capaz de provocar la transcripción de los genes estrógeno dependientes.

Normalmente se ha asumido que los ligandos del AhR reúnen una serie de características estructurales: se trataría de compuestos planos, policíclicos y aromáticos (Safe, 1990), de modo que podrían acomodarse en una zona de aproximadamente $14 \text{ \AA} \times 12 \text{ \AA} \times 5 \text{ \AA}$ al unirse al receptor (Waller y McKinney, 1995). Sin embargo se acumulan constantemente evidencias de que las características estructurales de los activadores del AhR son muy heterogéneas (Denison y Nagy, 2003) y se ha observado que puede ser activado por una gran cantidad de pesticidas que no cumplen los requerimientos estructurales citados (Ver por ejemplo Delescluse *et al.*, 2001 o Casado *et al.*, 2006).

8.4. PERTURBADORES ENDOCRINOS

Los compuestos que a continuación se citan son aquellos de los que existe constancia de que actúan como disruptores endocrinos. Aunque quizás la mayor parte de los fenómenos de disrupción endocrina observados en la naturaleza puedan ser debidos a estas sustancias hay



que encuadrar los datos que se van a aportar dentro de su justa dimensión. Conviene recordar que a nivel mundial se están utilizando normalmente unos 63.000 productos químicos diferentes, 3.000 de los cuales copan el 90 % de la producción total. Además, entre unos 200 y 1000 nuevos compuestos químicos son introducidos en el mercado cada año (Shane, 1994). Resulta evidente, por lo tanto, que la falta de conocimiento sobre las propiedades hormonales de estos compuestos es un lastre importante a la hora de establecer los agentes causales de los fenómenos de disrupción endocrina en la naturaleza.

8.4.1. Estrógenos naturales y sintéticos

El E2 es una molécula tetracíclica con un anillo aromático en su estructura y un peso molecular de 272 Da (Figura 1). La estructura de algunas sustancias estrogénicas muestra cierta similitud con la del E2: se trata de moléculas pequeñas con uno o más anillos aromáticos en su estructura. Sin embargo, ésta no es una regla general de modo que la molécula de algunas sustancias estrogénicas es muy diferente de la del E2.

Estrógenos naturales (como el E2 o la estrona, E1, figura 1) de origen humano o animal son liberados constantemente al medio ambiente y pueden alcanzar concentraciones elevadas en los cursos de agua (e.g., Rutishauser *et al.*, 2004). Estos estrógenos se excretan en forma de conjugados glucuronados o sulfatados y se hidrolizan a los compuestos activos durante el tratamiento en las depuradoras. Los primeros trabajos advirtiendo de la presencia de E2 en el medio acuático aparecieron ya en los años ochenta. Se estimó que una mujer en cinta puede excretar unos 10 μmol de estrógenos al día (Fostis, 1987). Y ya se observó que la gallinaza procedente de las granjas de pollos contenía aproximadamente 1 μmol / g de E2 (Shore *et al.*, 1988) o que otros animales de granja como las vacas, cerdos, caballos y ovejas también liberan cantidades importantes de estrógenos en el ambiente (Knights, 1980). En el año 1993, Shore *et al.* indicaron que en las aguas que llegaban a una depuradora municipal en el área de Tel Aviv podía haber hasta 518 pmol de E2/L y que en las aguas de salida de la depuradora se podían detectar hasta 184 pmol de E2/L. Estas concentraciones podían dispararse hasta 1260 pmol/L durante el verano (estación seca) en aguas depuradas de granjas. Finalmente se encontraron concentraciones



nes de hasta 80 pmol /L durante un verano seco en un lago de Israel. A partir de estos primeros trabajos ha habido repetidos informes sobre la presencia de E2 en medios acuáticos continentales. Se han detectado concentraciones de entre 1 y 48 ng/L en vertidos de depuradora en el Reino Unido (Desbrow *et al.*, 1998) o de hasta 7.8 ng/L en una depuradora del río Tamagawa en Japón (Nakada *et al.*, 2004).

Junto al E2 también se han detectado otros estrógenos naturales. La E1 puede alcanzar concentraciones relativamente altas en vertidos de depuradoras: hasta 76 ng / L (Nakada *et al.*, 2004; Desbrow *et al.*, 1998; Niven *et al.*, 2001). Sin embargo su potencia estrogénica es menor que la del E2, tal y como se determinó en un ensayo basado en el uso de levaduras transfectadas con el gen del E2 y el de la β -galactosidasa, como gen reportero, asociado a ERE (Este sistema se denomina YES, de «Yeast Estrogen System»): fue siete veces más baja en el estudio de Nakada *et al.*, 2004; tres veces más baja en el estudio de Rutishauser *et al.*, (2004); y unas cinco veces menor en Le Guével y Pakdel, (2001). El otro estrógeno natural, el estriol (E3, figura 1), sólo

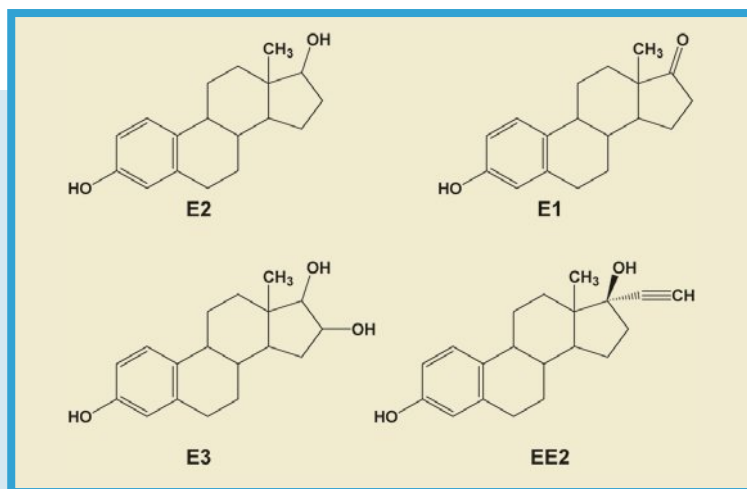


FIGURA 1.

Estructura de algunos estrógenos naturales y de un estrógeno sintético. Estrógenos naturales: E2 (17β-estradiol), E1 (estrone), E3 (estriol). El EE2 (etinil estradiol) es un estrógeno sintético usado como anticonceptivo.



se produce en cantidades significativas durante la preñez, siendo sintetizado por la placenta. Aunque también aparece en los cursos de agua (resultados propios no presentados) su concentración es menor que la del E2 o E1 y su potencia es 2.4×10^{-3} veces la del E2 (determinado en el ensayo YES, Rutishauser *et al.*, 2004).

En general los niveles de estrógenos en las aguas fluviales suelen ser mucho menores que los observados directamente en los vertidos debido al efecto de la dilución y de la biodegradación, así como a la adsorción a los sedimentos de los fondos que puede ser significativa debido a la marcada hidrofobicidad de estos compuestos. En general, las máximas concentraciones de estrógenos detectadas en aguas de río han sido de entre 1 y 5 ng/L (Duch y Ballschmiter, 2001). Sin embargo estas concentraciones aumentan en el material sólido de los fondos. Así, por ejemplo, en los sedimentos de varios ríos ingleses se encontraron concentraciones de E2 y de E1 que variaron entre 6 y 14 y entre 25 y 52 ng/kg peso seco (Peck *et al.*, 2004). Además estas concentraciones se mantuvieron relativamente constantes incluso a varios km bajo el punto de vertido y al combinar estos resultados con un modelo generado por ordenador se llegó a la conclusión de que los estrógenos podrían acumularse en sedimentos y alcanzar concentraciones relativamente altas a bastantes km de la fuente del vertido.

El 17α -etinil-estradiol (EE2, figura 1) es un estrógeno artificial de amplio uso porque es un ingrediente activo de la píldora contraceptiva. Ya en el año 1979 se apuntó como un contaminante en los vertidos municipales (Rathner y Sonneborn, 1979). Posteriormente se ha detectado con frecuencia en estos vertidos donde llega a concentraciones relativamente altas: por ejemplo, 7 ng/L en una planta depuradora en el Reino Unido (Desbrow *et al.*, 1998). De especial gravedad es el hecho de que este compuesto muestra una potencia estrogénica similar o incluso algo mayor que la del E2 (Le Guével y Pakdel, 2001; Rutishauser *et al.*, 2004) determinada en el ensayo YES.

8.4.2. Fitoestrógenos y micoestrógenos

Algunas sustancias capaces de actuar como estrogénicas tienen origen vegetal, son los fitoestrógenos. Se trata en todos los casos de polifenoles aunque pertenecen a diferentes familias de compuestos



químicos: isoflavonas, cumestanos, lignanos, lactonas de ácido resorcílico (micotoxinas que aparecen en algunas vegetales tras el ataque de un hongo) y estilbenos (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2000). La actividad hormonal de estas sustancias se hizo patente hace tiempo cuando provocaron caídas de fertilidad en ovejas que pastaban leguminosas como el trébol. La gran cantidad de fitoestrógenos presentes en estas plantas causaron una reducción de los niveles de progesterona (Obst y Seamark, 1970) y una inhibición de la liberación de LH (Leavitt y Wright, 1965). Debido a su efecto estrogénico, provocaron en ovejas estros permanentes y en machos castrados procesos de feminización, como crecimiento de mamas e incluso secreción de leche (Adams, 1995). En el ensayo YES se ha observado que algunos de estas sustancias, como el cumestrol, el α -zearalenol o la genisteína, provocan una inducción de la β -galactosidasa hasta niveles similares a los que induce el E2, pero a concentraciones entre 100 y 1000 veces mayores que la del E2 (Collins *et al.*, 1997). En hepatocitos cultivados de trucha y esturión diversos fitoestrógenos mostraron su capacidad de inducción de VTG. Además esta inducción fue bloqueada por tamoxifeno, lo que indica la mediación del ER en este proceso (Latonnelle *et al.*, 2002).

8.4.3. Pesticidas organoclorados

Los pesticidas organoclorados constituyen un grupo de sustancias con marcado carácter estrogénico. De ellos quizás el más nombrado sea el DDT (dicloro-difenil-tricloroetano, figura 2). Las propiedades insecticidas de este compuesto y su aparente inocuidad para los vertebrados hicieron que, desde su introducción en el mercado en el año 1942 por Geigy, su uso se extendiera por prácticamente todo el planeta. El DDT técnico es de una composición variable y puede consistir en 11 o más compuestos, principalmente el isómero *p,p'*- (hasta un 70 %) y el isómero *o,p'*- (15 al 30 %). Sin embargo, el descubrimiento de su toxicidad a largo plazo asociada con su alta capacidad de bioacumulación, provocó la prohibición del DDT en los países desarrollados en los años 70. No obstante, en las regiones del planeta en vías de desarrollo sigue siendo utilizado como una herramienta eficaz en la lucha contra la malaria.

Uno de los grandes problemas que plantea el DDT es su elevada resistencia a la degradación y su persistencia, así como su lipofilia. Su



principal metabolito, el dicloro-difenil-dicloroetileno (DDE) también se acumula en los tejidos de los vertebrados y, de hecho, muestra en ellos incluso mayor persistencia que el compuesto original (Jaga y Dharmani, 2003). El resultado es que el DDT y el DDE aparecen a lo largo de toda la cadena trófica en los ambientes más variados. Por ejemplo, en los grandes lagos de Norteamérica las concentraciones de DDT en los peces disminuyeron tras alcanzar un máximo en 1972, pero después han ido aumentando probablemente debido al transporte atmosférico a gran escala (Kelly *et al.*, 1991).

La estrogenicidad del DDT se ha mostrado en repetidas ocasiones. Por ejemplo, Shelby *et al.*, (1996) utilizaron tres sistemas diferentes para estudiar la estrogenicidad del DDT: unión competitiva al ER de ratón, activación transcripcional en la línea celular HeLa transfectada con

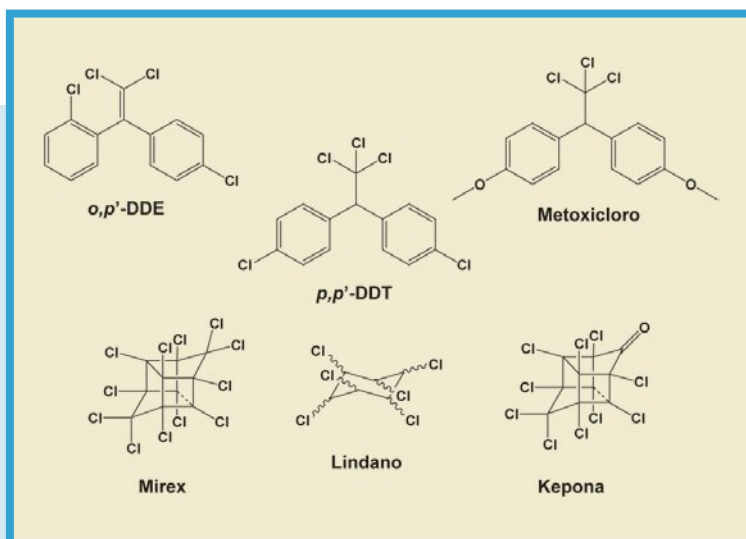


FIGURA 2.

Algunos pesticidas organoclorados descritos como estrogénicos. El DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) es un insecticida ampliamente utilizado en el pasado. Se muestra en la figura el isómero *p,p'*-DDT con los dos átomos de cloro unidos a los anillos fenilo en posición para. El DDE es el principal metabolito del DDT encontrado en el tejido graso de los animales. Se muestra el isómero *o,p'*-DDE, con los átomos de cloro unidos a los anillos fenilo en posiciones orto y para.



plásmidos que contenían un receptor de estrógenos y un ERE ligado a un gen reportero; y el ensayo uterotrófico basado en la observación de aumento del peso del útero en ratones inmaduros como consecuencia de un efecto estrogénico. En los tres ensayos el DDT apareció como estrogénico. También indujo la expresión del gen reportero en un ensayo YES (Gaido *et al.*, 1997) pero resultó ser 8×10^6 veces menos potente que el E2.

Otros pesticidas organoclorados también se consideran estrogénicos (Sumpter *et al.*, 1996). El Lindano (nombre comercial dado al isómero y del hexaclorociclohexano, HCH, figura 2) fue capaz tanto de provocar la producción de VTG en hepatocitos de trucha arco iris in vitro como de activar el ER en el ensayo YES (Petit *et al.*, 1997). La estrogenicidad del metoxicloro (el derivado bis-*p*-metoxi del DDT, figura 2) ya se observó a mediados de los 70 tanto in vitro como in vivo (Bulger *et al.*, 1978). El metoxicloro en mamíferos no es capaz por sí mismo de unirse y activar el ER: ha de sufrir un proceso de desmetilación hasta sus derivados mono- o bis-desmetilados (Bulger *et al.*, 1978). Un fenómeno similar se ha observado posteriormente en peces (Schlenk *et al.*, 1998). También hay que citar como estrogénicos al dieldrín, aldrín, kepona (clordecona, figura 2) y Mirex (figura 2) entre otros (revisado por Sumpter *et al.*, 1996).

De particular relevancia puede ser el hecho de que en algunos trabajos se ha mostrado que la combinación de algunos de estos pesticidas débilmente estrogénicos puede tener un efecto sinérgico (Arnold *et al.*, 1996) de modo que su efecto medioambiental quizás esté siendo subestimado en los estudios de laboratorio que contemplan únicamente compuestos individuales. También hay que resaltar las enormes diferencias entre las estructuras de estos compuestos, lo que da una idea de la diversidad de moléculas capaces de activar el ER.

Se ha observado además que el DDT y el DDE pueden actuar como antiandrógenos. Aparte de numerosas evidencias encontradas en mamíferos (US Department of Health and Human Services, 2002) también se ha visto en peces que los isómeros *o,p'* y *p,p'* de ambos compuestos fueron capaces de desplazar al andrógeno dihidrotestosterona en su unión a un subtipo de receptor de andrógenos expresado en ovario de *Micropogonias undulatus* y de *Paralabrax clathratus* (Sperry y Thomas, 1999).



8.4.4. Alquilfenoles y derivados

Los alquilfenoles polietoxilados («Alkylphenol ethoxylates», APEs) son un grupo de tensioactivos no iónicos ampliamente utilizados a nivel industrial y como emulsificantes en detergentes, pinturas, pesticidas o incluso cosméticos (Renner, 1997). En el año 1996 su producción mundial se calculó en unas 500.000 tm. Se ha descubierto que los productos de la degradación de los APEs son más tóxicos que el producto original. En los procesos de depuración, la acción bacteriana da lugar a la aparición de APEs de cadena corta (como el nonilfenol dietoxilado, figura 3), ácidos carboxílicos de alquil fenoles (por ejemplo, ácido carboxílico del nonilfenol, figura 3) y alquil fenoles (APs) propiamente dichos (figura 3), y todos estos productos pueden alcanzar los cursos de agua. Tal y como se observa en la figura 3, estructuralmente los alquilfenoles están constituidos por una cadena hidrocarbonada que se une a un anillo fenólico en posición *orto*, *meta* o *para*. Por su parte, las cadenas alquílicas pueden aparecer como lineales o bien como cadenas complejas ramificadas (figura 3).

La presencia de los alquilfenoles y de APEs en el medio acuático se ha observado en numerosos trabajos (Bennett y Metcalfe, 2000; Stachel *et al.*, 2003), pero sus concentraciones son muy variables dependiendo del área geográfica de que se trate. Además, muchos de

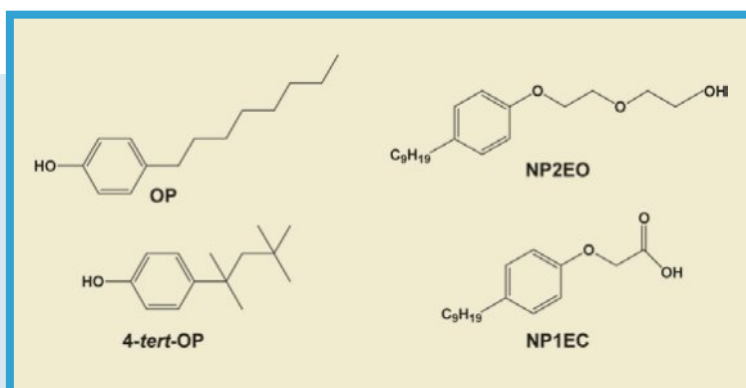


FIGURA 3.

Estructura del octilfenol (OP), del nonilfenol dietoxilado (NP2EO), del 4-*tert*-OP y del ácido carboxílico del nonilfenol (NP1EC).



estos estudios se han centrado en la presencia del nonilfenol (NP) y del octilfenol (OP), probablemente tanto por limitaciones en las técnicas de análisis como por el hecho de que estos dos compuestos han mostrado una clara capacidad estrogénica (White *et al.*, 1994), particularmente el OP (Routledge y Sumpter, 1997). Como otras sustancias estrogénicas los alquilfenoles son hidrófobos de modo que muestran una fuerte tendencia tanto a adsorberse a diversas superficies como a acumularse en tejidos lipídicos, así que se ha observado que pueden alcanzar concentraciones importantes tanto en animales (Ekelund *et al.*, 1990; Ahel *et al.*, 1993) como en sedimentos.

La potencia estrogénica de estos compuestos varía dependiendo del sistema experimental que se utilice (White *et al.*, 1994), pero se puede afirmar, generalizando, que la mayor potencia estrogénica corresponde al OP (White *et al.*, 1994; Routledge y Sumpter, 1997) y que para un alquilfenol concreto y sus correspondientes derivados etoxilados su potencia aumenta a medida que disminuye el tamaño de la cadena etoxilada (White *et al.*, 1994). Además, parece ser que el grado de ramificación de la cadena alquilada está directamente relacionado con la potencia estrogénica del compuesto: el 4-*tert*-OP ha mostrado una potencia estrogénica hasta 60 veces mayor que la del 4-*sec*-OP (Routledge *et al.*, 1994) en el sistema YES. No obstante, la estrogenicidad de estos compuestos es mucho menor que la del E2: por ejemplo el 4-*tert*-OP en el sistema de levaduras citado fue 1.000 veces menos potente que el E2 y en el otro extremo, el 4-*tert*-butylphenol fue 1.500.000 veces menos potente.

8.4.5. Ftalatos y bisphenol-A

Los ftalatos son plastificantes utilizados en la producción de cloruro de polivinilo (PVC) para conseguir en este material cierta flexibilidad y manejabilidad. En menor medida los ftalatos se usan también en pinturas, lacas y cosméticos (Harris *et al.*, 1997). Estos compuestos están muy extendidos en el medio ambiente. Se liberan tanto en el proceso de fabricación como a partir de los materiales en que se encuentran y se han detectado tanto en sedimentos como en agua y aire (Fatoki y Vernon, 1990). Se han observado incluso en alimentos, especialmente grasos, puesto que pueden migrar desde los materiales



plásticos usados en el empaquetado (Sharman *et al.*, 1994). Un ftalato ampliamente utilizado que está muy extendido por el medio ambiente y que ha sido objeto de numerosos estudios es el di-(2-etilhexil)ftalato (DEHP. Figura 4) cuyo uso ha alcanzado la cifra de aproximadamente 1.800.000 tm/año (Cadogan y Howick, 1996).

Debido a que no han sido tan estudiados como otros grupos de compuestos es difícil establecer generalizaciones en cuanto a la actividad de estas sustancias. En un trabajo utilizando el sistema YES se observó que la potencia estrogénica relativa de estos compuestos seguía el orden butil benzil ftalato (BBP) > dibutil ftalato (DBP) > diisobutil ftalato (DIBP) > dietil ftalato (DEP) > diisononil ftalato (DINP) (algunas de estas estructuras aparecen en la figura 4). Sus potencias fueron entre 10^6 y 5×10^7 menores que la del E2. (Harris *et al.*, 1997).

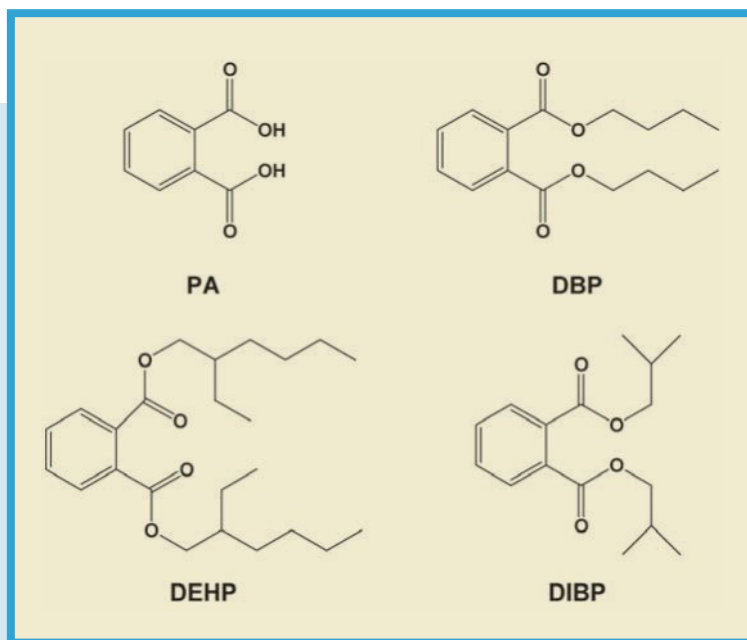


FIGURA 4.

Estructura de algunos ftalatos. Estos compuestos son derivados del ácido ftálico («Phtalic acid», PA). En esta figura se muestran el di-n-butilftalato (DBP), el di(2-etilhexil)ftalato (DEHP) y el di-iso-butilftalato (DIBP).



En este ensayo el DEHP no mostró estrogenicidad, aunque numerosos estudios relacionan a este compuesto con aumento de incidencia de alergias u otros trastornos de tipo inmunológico en mamíferos (ver por ejemplo Takano *et al.*, 2006). Picard *et al.*, (2001) mostraron que el BBP, y no sus metabolitos, es el responsable de la actividad estrogénica detectada a través de la proliferación de células MCF 7. Según estos autores, esto explicaría la falta de actividad del BBP en ratas in vivo, ya que se metabolizaría rápidamente y sus metabolitos muestran una muy limitada o incluso ausencia total de actividad estrogénica.

El bisfenol-A (BPA. Figura 5) es un compuesto de amplio uso que se polimeriza para formar plásticos de policarbonato (figura 5). El hecho de que el enlace éster que une los diferentes monómeros de BPA no sea altamente estable hace que con el tiempo el polímero se degrade y que el BPA se libere a los medios con los que está en contacto como agua o comida. Además de en los plásticos policarbonatados, el BPA aparece en resinas epoxi y otros tipos de plásticos como polisulfonas, polifenoles, y poliestirenos (Krishnan *et al.*, 1993). El resultado es que el BPA está presente en gran número de utensilios y materiales de uso normal de modo que las personas estamos expuestas continuamente a este compuesto. Un estudio reciente encontró BPA en un 95 %

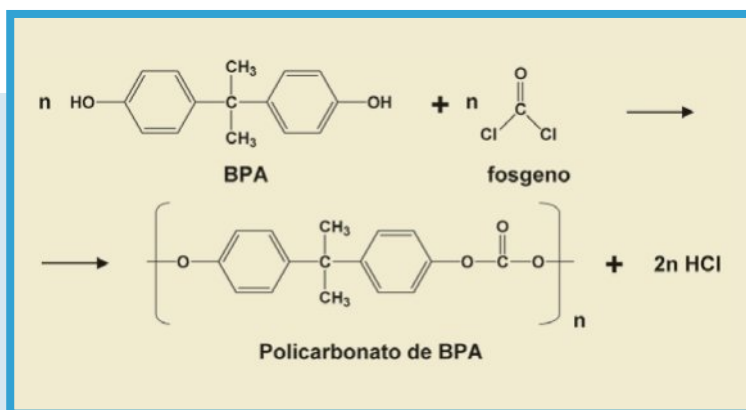


FIGURA 5.

Reacción de formación del policarbonato de bisfenol A («Bisphenol A», BPA). El BPA reacciona con el fosgeno para formar el policarbonato a la vez que libera ácido clorhídrico.



de muestras de orina (Calafat *et al.*, 2005). Y por la misma razón el BPA está extendido de forma generalizada en el medio ambiente. Por ejemplo, el BPA puede aparecer en ríos y estuarios a concentraciones de entre 5 y 1.900 ng/l. En los sedimentos puede aparecer en concentraciones de 5 hasta 100 µg/kg. Además este compuesto es bastante persistente (Rippen, 1999).

En mamíferos el BPA se ha encontrado en el fluido folicular, en el líquido amniótico y en el suero fetal (Zalko *et al.*, 2003). Esto causa especial preocupación puesto que el embrión en desarrollo es particularmente susceptible a productos químicos con actividad hormonal. De hecho se ha observado que la exposición perinatal a BPA afecta profundamente al desarrollo de tejidos cuando son dependientes de la presencia de estrógenos, incluso largo tiempo después de la exposición (Muñoz-de-Toro *et al.*, 2005).

8.4.6. Dioxinas, furanos, hidrocarburos poliaromáticos

Las policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDDs) y los policlorodibenzofuranos (PCDFs) son hidrocarburos aromáticos halogenados tricíclicos constituidos por dos anillos bencénicos unidos por dos átomos de oxígeno en carbonos adyacentes en cada uno de los anillos de benceno en el caso de las PCDDs y por un átomo de oxígeno y un enlace carbono-carbono en carbonos adyacentes en los PCDFs (figura 6). Cada uno de estos compuestos puede tener hasta ocho átomos de cloro y dependiendo del número total de átomos de cloro y de su posición relativa en la molécula pueden aparecer distinto número de congéneres: 75 en el caso de las PCDDs y 135 en el caso de los PCDFs. La 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) es la más tóxica de las dioxinas y sus características químicas, bioquímicas y tóxicas han sido estudiadas en profundidad. Se la considera el ligando y activador modelo del AhR (Safe, 1995). La potencia tóxica de las PCDD y los PCDF puede referirse a la de la TCDD y los valores resultantes se conocen como factores de equivalencia tóxica («toxic equivalency factor», TEF). La potencia tóxica de una mezcla de PCDDs y de PCDFs se calcula multiplicando la concentración de cada conéngere por el correspondiente TEF y sumando los resultados. Lo que se obtiene son los equivalentes



de TCDD («2,3,7,8 -tetraclorodibenzo-*p*-dioxine equivalents», TEQ) de la mezcla (Safe, 1990).

Estos compuestos se forman durante la síntesis y uso de fenoles clorados y de otros compuestos aromáticos halogenados, aunque aparecen numerosas fuentes industriales de PCDDs y PCDFs (Fiedler, 1993). También aparecen en pequeñas cantidades cuando se quema material orgánico en presencia de átomos de cloro. De hecho, la mayor parte de las dioxinas que aparecen en el ambiente se producen durante la combustión de carbón o de madera tratada, en las fundiciones de metal y en los motores diesel. Debido a su persistencia se encuentran ampliamente distribuidas por todos los ambientes: en suelo, agua y aire y a causa de su lipofilia tienden a acumularse en los tejidos adiposos de los organismos, estando distribuidas por toda la cadena trófica (Theelen *et al.*, 1993).

Aunque en ocasiones se citan como estrogénicos (Sumpter *et al.*, 1996), el hecho es que estos compuestos son ligandos de AhR y actúan como antiestrogénicos (Safe, 1995). En peces, por ejemplo, el efecto antiestrogénico de la TCDD, del 2,3,7,8-tetraclorodibenzofurano o del 2,3,4,7,8-pentaclorodibenzofurano se observó en hepatocitos de trucha arco iris mantenidos en cultivo (Anderson *et al.*, 1996a), al provocar todos estos compuestos una disminución de la producción de VTG previamente inducida por el E2. Además, la posible implicación del AhR en este efecto se corroboró por la relación directa entre la capacidad que tenían los diferentes compuestos usados en el estudio de inducir el CYP1A y su potencia antiestrogénica.

Por su parte, los hidrocarburos poliaromáticos (PAHs, de «polyaromatic hydrocarbons») constituyen un grupo variado de sustancias (ver figura 6), producidas en diferentes procesos industriales y cuya capacidad de bioacumulación y biomagnificación varía enormemente dependiendo no sólo del compuesto sino también del grupo taxonómico al que se esté haciendo referencia. La antiestrogenicidad de estos compuestos en peces se ha evidenciado por su capacidad para provocar una disminución de la producción de VTG inducida por el E2 tanto *in vitro*, utilizando cultivos primarios de hepatocitos de peces (Navas y Segner, 2000. Revisado por Navas y Segner, 2006) como *in vivo* (Anderson *et al.*, 1996b).



8.4.7. Bifenilos policlorados

En numerosas ocasiones se ha descrito a los bifenilos policlorados (PCBs, figura 6) como sustancias estrogénicas y aunque esta afirmación no es equivocada, el realizarla de una manera general puede llevar a confusión, por lo que conviene profundizar un poco en este punto. La molécula de PCB consta de un bifenilo al que se unen desde un mínimo de un átomo de cloro hasta un máximo de diez. Dependiendo del número de átomos de cloro y de su posición relativa en la molécula se pueden encontrar hasta 209 congéneres diferentes. Estos congéneres se numeran desde el 1 hasta el 209 siguiendo una norma establecida en la IUPAC («Internacional Union of Pure and Applied Chemistry». Se pueden encontrar en la siguiente página de Internet: <http://www.epa.gov/toxteam/pcbtable.htm>). En estudios estructurales se ha considerado que algunos PCBs (particularmente los metabolitos hidroxilados de los PCBs *orto*-sustituidos) podrían estar actuando como estrogénicos, mientras que los PCBs sin sustituciones en *orto* podrían adoptar una estructura planar y actuar como antiestrogénicos (McKinney y Waller, 1994). En cualquier caso, dada la plétora de estructuras a las que nos estamos refiriendo al hablar de PCBs conviene tomar con reserva este tipo de afirmaciones, no sólo aquí, si no en cualquier artículo o libro que se consulte (Hay que advertir al lector de la gran cantidad de inexactitudes sobre este tema que aparecen con más frecuencia de la deseada en la literatura científica. Para una consulta detallada sobre la estructura de los PCBs y las posibles relaciones entre su estructura y su toxicidad se puede recurrir al trabajo de Chana *et al.*, 2002).

La producción comercial de los PCBs se inició en los años 20. Estos compuestos aparecen comercialmente como mezclas complejas de congéneres. En Estados Unidos la compañía Monsanto comercializó los PCBs bajo el nombre de Aroclor y General Electric bajo el nombre de Pyranol. El producto comercial recibía un código de cuatro dígitos colocado tras el nombre general: los dos primeros dígitos se refieren al número de átomos de carbono en el esqueleto de bifenilo (por lo tanto, para los PCBs estos dígitos son 12) y los dos últimos dígitos indican el porcentaje total de cloro en la mezcla. Por lo tanto y como ejemplo, el Arocloro 1260 contiene 60 % de cloro en su masa total. Una excep-



ción es el Aroclor 1216, que tiene un 42 % de cloro. Los PCBs se han usado básicamente en transformadores y acumuladores eléctricos por sus propiedades dieléctricas y aislantes, aunque también aparecen en aceites lubricantes y como aditivos en pesticidas, pinturas, adhesivos y plásticos, entre otros materiales.

Debido a su baja degradabilidad los PCBs están extendidos por todo el medio ambiente y dadas sus características lipófilas además tienden a acumularse en los organismos y aparecen en toda la cadena trófica.

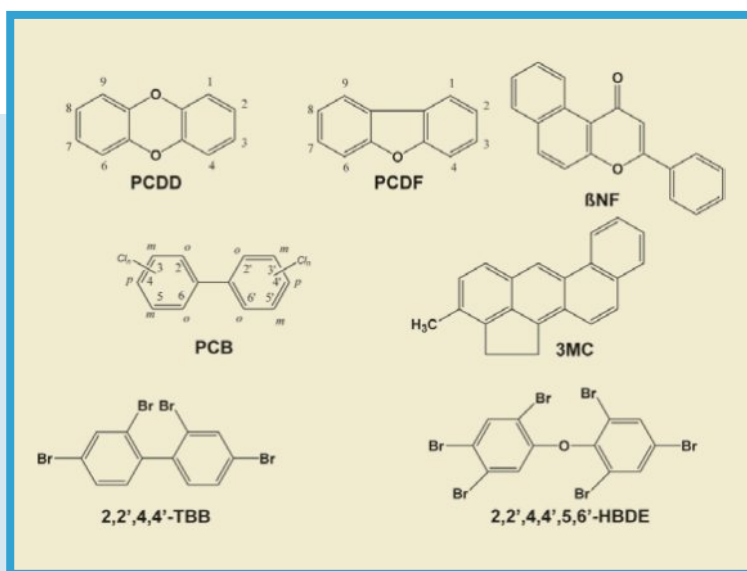


FIGURA 6.

Estructura general de las policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDD) y de los policlorodibenzofuranos (PCDF). Se señala en ellas la numeración de los átomos de carbono a los que pueden enlazarse átomos de cloro. También se muestra la estructura de dos hidrocarburos poliaromáticos: el 3-metilcolantreno (3MC) y la β-naftoflavona (βNF). En la estructura general de la molécula de los bifenilos policlorados se muestra la numeración de los carbonos de ambos anillos de la molécula y también se han anotado las posiciones *orto* (*o*), *meta* (*m*) y *para* (*p*). Esas numeraciones son las mismas para los bifenilos polibromados (PBBs) y para los bromodifenil éteres (PBDEs). Se muestran como ejemplo el 2,2',4,4'-tetrabromobifenilo (TBB) y el 2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter (HBDE).



Este hecho, junto a la preocupación por su toxicidad, hicieron que su fabricación y uso se prohibiera en los Estados Unidos y Europa en los años 70. No obstante, existen todavía cantidades ingentes de PCBs acumulados en productos y aparatos antiguos, que han de ser eliminadas del modo más adecuado.

La estrogenicidad de preparados comerciales de PCBs se ha observado en repetidas ocasiones y en diferentes sistemas *in vitro* (Aroclor 1221, 1248 y 1268. Petit *et al.*, 1997) e *in vivo*: por ejemplo, el Aroclor 1221 tuvo un efecto estrogénico al provocar el aumento del peso del útero en ratas *in vivo* (Ecobichon y MacKenzie, 1974). También existen informes sobre la estrogenicidad de algunos congéneres individuales: por ejemplo el 3,5,3',5'-tetraclorobifenilo (PCB80) mostró una débil actividad estrogénica tanto *in vitro* (proliferación de células MCF7) como *in vivo* (aumento de peso uterino en ratones inmaduros) (Nesaretnam y Darbre, 1997). El 3,3',4,4'-tetraclorobifenilo (PCB77) mostró un comportamiento similar (Nesaretnam *et al.*, 1996). Su antiestrogenicidad ha quedado demostrada también en numerosos estudios. En peces se puede citar el mismo estudio de Anderson *et al.*, (1996a) que se ha nombrado en el apartado de las dioxinas. En este trabajo se observó con tres PCBs diferentes que a medida que aumentaba su capacidad de inducir el CYP1A también aumentaba su potencia inhibidora de la producción de VTG previamente inducida con E2.

8.4.8. Bifenilos polibromados y bifenil éteres polibromados

El esqueleto de los bifenilos polibromados (PBBs, figura 6) es similar al de los PCBs, con un sistema de bifenilo sustituido con bromo (entre uno y diez átomos). Los PBBs también presentan hasta 209 congéneres diferentes dependiendo del número de átomos de bromo que presenten en la molécula y de su posición relativa. En los polibromodifeniléteres (PBDEs) los dos anillos de fenilo están unidos por un átomo de oxígeno, y también pueden presentar hasta 209 congéneres diferentes. Los diferentes congéneres, tanto en los PBBs como en los PBDEs, se numeran siguiendo el mismo esquema de la IUPAC utilizado para los PCBs.

Ambos grupos de compuestos, pero sobre todo los PBDEs, sirven como retardantes de llama en una gran variedad de productos comer-



ciales y domésticos (revisado por Hites, 2004). Por ejemplo, la espuma de poliuretano, muy utilizada como aislante, es inflamable a menos que se trate con retardantes de llama como los PBDEs (Hale *et al.*, 2002). Puesto que la legislación de muchos países desarrollados es particularmente estricta en cuanto a la resistencia a las llamas que han de presentar puertas, muebles, electrodomésticos y diversos aparatos, los PBDEs alcanzaron una gran importancia comercial.

Los PBDEs aparecen disponibles en el comercio como tres productos diferentes, dos de los cuales son mezcla de varios congéneres. El penta-PBDE contiene 2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter (BDE47), 2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter (BDE99), 2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter (BDE100), 2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenil éter (BDE153), y 2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter (BDE154) en una proporción aproximada de 9:12:2:1:1 (Hale *et al.*, 2001; Sjödin *et al.*, 1998). El octa-PBDE contiene varios congéneres desde hexa hasta nona-brominados. Finalmente el deca-PBDE está compuesto prácticamente en exclusiva por decabromodifenil éter (BDE209). No obstante, como la mayoría de las mezclas químicas comerciales, la composición de estos productos varía dependiendo del fabricante y del lote de producción. Las ventas totales a nivel mundial de PBDEs alcanzaron en el año 2003 las 70.000 tm (Bromine Science and Environmental Forum; Hites, 2004). Aproximadamente el 95 % del penta-PBDE se consume Norteamérica. En Europa se ha prohibido el uso de los penta y octa-PBDEs, pero se mantiene el del deca-PBDE. Los PBBs por su parte, vieron parada su producción en los años 70 en los países desarrollados debido a la preocupación que despertó su toxicidad, pero sobre todo su resistencia a la degradación.

Uno de los grandes problemas asociados a estos compuestos es su persistencia ambiental, lo que hace que aparezcan muy extendidos en la biota. Por ejemplo, a pesar de que en Estados Unidos la producción de PBBs se paró hace tres décadas, en los peces de los Grandes Lagos estos compuestos todavía alcanzan concentraciones apreciables y disminuyen con una gran lentitud a lo largo de los años (su vida media es mayor de 19 años) (Zhu y Hites, 2004). Algunos PBDEs han mostrado capacidad estrogénica induciendo la producción de VTG en hepatocitos de trucha arco iris mantenidos en cultivo: es el caso del BDE47, del



BDE99, del 2,3,3',4,4',5,5',6-heptabromodifenil éter (BDE205) y del 2,2',4,4',5,5'-hexabromobifenilo (PBB153) (Nakari y Pessala, 2005). No obstante estos mismos compuestos no tuvieron ningún efecto en levaduras transformadas que contenían el ER humano.

8.5. PERTURBACIÓN ENDOCRINA EN POBLACIONES DE PECES. EJEMPLOS CONCRETOS

Existen numerosos estudios de laboratorio que han utilizado tanto sistemas in vitro como in vivo para indagar en los mecanismos de acción de los disruptores endocrinos y sus posibles efectos en la multitud de sistemas hormonales y receptores que aparecen en un organismo. Se va a evitar hacer una enumeración sistemática de todos estos estudios puesto que la finalidad de este capítulo no es profundizar en mecanismos de acción o en efectos celulares o fisiológicos, sino explicar con mayor detalle algunos ejemplos de disrupción endocrina detectados en poblaciones de peces, ya que precisamente estos casos reales son los que pueden tener una mayor relevancia para la piscicultura, para después comentar los posibles efectos que pudieran aparecer en los peces cultivados.

8.5.1. Efectos estrogénicos en poblaciones de peces: producción de vitelogenina

El mejor ejemplo de efectos estrogénicos en peces es probablemente el que se observa como consecuencia de la contaminación de los cursos de agua por vertidos de depuradoras municipales. Este fenómeno comenzó a detectarse en el Reino Unido a finales de los años setenta. Personal de la Autoridad encargada de la gestión del río Támesis observó una baja incidencia (5 %) de intersexo en *Rutilus rutilus* capturados aguas abajo del vertido de una depuradora en el río Lea (Tyler y Routledge, 1998). Aparte de un informe interno no se tomaron más medidas. A mediados de los años ochenta se encontró que los machos de una piscifactoría de trucha arco iris mostraban concentraciones altas de VTG (Tyler y Routledge, 1998) lo que era indicativo de la presencia de sustancias estrogénicas en el agua. El hecho de que hubiera un vertido de depuradora municipal



aguas arriba de donde se encontraba la piscifactoría ya hizo pensar en la posibilidad de que las sustancias estrogénicas vinieran de allí. Se planteó un trabajo en el que machos de trucha arcoiris fueron expuestos en 28 localidades de Inglaterra y Gales in situ (encerrados en jaulas) a los vertidos de depuradoras (Purdom *et al.*, 1994). La exposición duró de dos a tres semanas. En algunos puntos la toxicidad de las aguas causó la muerte de los peces, pero cuando consiguieron sobrevivir se observó que las aguas de las depuradoras eran fuertemente estrogénicas. Se produjo un incremento de la cantidad de VTG en plasma de entre 500 y 50.000 veces las concentraciones iniciales. Experimentos similares fueron realizados posteriormente, por ejemplo en el río Lea (Harries *et al.*, 1996), uno de los más largos del sureste de Inglaterra, en diversos puntos por encima y por debajo de puntos de vertido de depuradoras. La exposición de los machos de trucha a las aguas duró por lo menos tres semanas y se observó que los niveles de VTG aumentaron, en algunos casos hasta niveles bastante elevados (580 µg/ml), con respecto a los niveles de VTG detectados previamente al inicio del experimento (aproximadamente 10 ng/ml). Estos resultados se corroboraron en otro experimento realizado en otros cinco ríos del sureste de Inglaterra (Harries *et al.*, 1997). En cuatro de los cinco ríos, se observó de nuevo un incremento de la concentración de VTG en plasma (se llegó hasta 10^7 ng/ml frente a los menos 10 ng/ml detectados en los controles o antes de iniciarse el experimento) en los peces mantenidos justo en el punto de vertido o muy cerca de él, cuando el agua de salida de la depuradora no había llegado a diluirse con la del río. En dos de los ríos este efecto se observó corriente abajo, hasta 1.5 y 5 Km por debajo del punto de vertido. Teniendo en cuenta que la concentración de VTG en salmónidos puede alcanzar, tanto de forma natural (Bon *et al.*, 1997) como después de haber sido estimulada con estrógenos naturales (Scott y Sumpter, 1983) o sintéticos (Sheahan *et al.*, 1994), valores de varias decenas de mg/ml sólo en uno de los ríos se alcanzaron niveles similares a los que provoca naturalmente un efecto estrogénico (el río Aire). En algunos casos los peces mantenidos en el río mostraron una reducción significativa del índice gonadosomático y un aumento significativo del índice hepatosomático respecto a los controles mantenidos en agua declarada en el laboratorio.



Evidentemente se llegó a la conclusión de que el efecto estrogénico debía de haber sido originado por sustancias presentes en vertidos domésticos. Se apuntó como posible causante del efecto al EE2, pero puesto que no pudo ser detectado en las aguas de un modo fiable (Aherne *et al.*, 1985), se consideró como poco probable (Harries *et al.*, 1997). Sin embargo sí que pareció plausible que los alquilfenoles hubieran producido el fenómeno observado puesto que en el río donde el efecto fue más pronunciado (río Aire) aparecieron concentraciones de NP de hasta 25 µg /L y en una serie de experimentos previos se vio que el NP es capaz de retrasar el crecimiento testicular después de tres semanas de exposición a una concentración de 20µg /L (Jobling *et al.*, 1996). Esto concordaba con la reducción del índice gonadosomático detectado en los peces expuestos en el campo a las aguas de depuradora (Harries *et al.*, 1997). Finalmente también se achacó la producción de VTG a la posible presencia de algunos pesticidas, como el Lindano, el Toxafeno o el Dieldrin todos ellos catalogados como estrogénicos. De hecho el Lindano y el Dieldrin habían sido citados en el río Aire (Shaw, 1994).

Para dar respuesta a todos estos interrogantes se llevaron a cabo una serie de trabajos basados en el fraccionamiento de los vertidos por técnicas de HPLC y evaluación de la potencia estrogénica de las fracciones mediante levaduras transformadas con el receptor de estrógenos y un gen informante. La identificación de los compuestos presentes en las fracciones con actividad estrogénica evidenció que los estrógenos naturales (E2 y E1) y sintéticos (EE2) podían ser en buena medida los responsables de los efectos observados (Desbrow *et al.*, 1998).

A partir de estos primeros trabajos la inducción de VTG en machos de peces en aguas continentales se ha observado en repetidas ocasiones a nivel mundial. En los Estados Unidos, uno de los primeros trabajos publicados sobre el tema es el de Folmar *et al.* (1996). En este estudio se vio que machos de carpa (*Cyprinus carpio*) capturados en un canal natural del río Mississippi, que recoge el vertido de la depuradora de la ciudad de San Pablo, mostraron niveles de VTG en el suero significativamente más altos que aquellos que aparecían en machos de carpa capturados en un río clasificado como de referencia por las autoridades estadounidenses. Incluso en ambientes marinos se ha observado



un efecto de este tipo. En machos de lenguado capturados en diversos estuarios del Reino Unido se observó una inducción de la producción de VTG (Allen *et al.*, 1999). Esta inducción fue especialmente fuerte en los estuarios del Tees, Mersey y Tyne, en los que los principales vertidos son de origen industrial y muestran niveles especialmente altos de alquilfenoles y alquilfenoles polietoxilados (Revisado por Vos *et al.*, 2000). Se observó una disminución gradual en la producción de VTG a medida que la toma de muestras se iba alejando de los puntos de vertido. Lo curioso es que los efectos estrogénicos se llegaron a observar en peces capturados en las zonas de puesta mar adentro en el «Southern Bight». Teniendo en cuenta que la VTG persiste en la sangre de los machos durante varias semanas después de ser inducida y, también, la naturaleza eurihalina de los lenguados no es de extrañar que la exposición a sustancias estrogénicas se hubiera producido en realidad en los estuarios (Vos *et al.*, 2000). En el Mediterráneo los efectos estrogénicos se han observado en una especie pelágica como es el pez espada (*Xiphias gladius*): tres machos capturados en su medio natural, mostraban niveles anormalmente altos de VTG (Fossi *et al.*, 2001).

El efecto a largo plazo de la exposición a estos estrógenos a través de las aguas sobre los peces adultos o sobre su descendencia no fue evidente en un principio. No obstante se especuló con el hecho evidente de que puesto que los estrógenos juegan un papel fundamental en el desarrollo sexual y en la regulación del proceso reproductivo, las alteraciones en los niveles circulantes de sustancias con un efecto estrogénico podrían ser nocivos para el proceso reproductor (Harries *et al.*, 1997). Normalmente los machos de trucha arco iris presentan unos niveles muy bajos de VTG (Copeland, 1986) en condiciones naturales y necesitan de aproximadamente cinco meses para eliminar la VTG que producen tras un estímulo estrogénico (Elliott *et al.*, 1979). La síntesis de VTG bajo la estimulación de estrógenos exógenos le causa al pez probablemente un importante estrés metabólico que puede ocasionar daño en el riñón y el hígado desembocando en procesos de necrosis y quizás en la muerte (Herman y Kincaid, 1988). Por otra parte, la producción de VTG de una manera continuada podría estar asociada con la desviación de proteínas y lípidos vitales y con una pérdida de calcio desde las escamas, lo que haría a los peces más susceptibles



al contagio y efectos de enfermedades (Carragher y Sumpter, 1991). Los niveles elevados de VTG se han asociado con una reducción en la producción de E2 mediante mecanismos de retroalimentación (Reis-Henriques *et al.*, 1997) lo que podría redundar negativamente en la calidad de los huevos. A pesar de todo lo expuesto, no resultaba, en un principio, evidente de qué modo esa inducción de la producción de VTG podía estar afectando a las poblaciones de peces y qué consecuencias podría tener a nivel ecológico.

8.5.2. Efectos estrogénicos en poblaciones de peces: alteraciones en el desarrollo gonadal

Puesto que existía gran número de estudios de laboratorio, realizados en su mayor parte dentro del marco de trabajos de acuicultura, que evidenciaban que el tratamiento con estrógenos naturales durante el periodo de diferenciación sexual podía afectar al desarrollo sexual de peces, causando la aparición de gran número de animales intersexo o provocando incluso un cambio total de sexo (Piferrer, 2001) se pensó que la contaminación por estas sustancias estrogénicas también podría alterar el desarrollo sexual normal. En un estudio de laboratorio Gimeno *et al.* (1996) vieron que un alquilfenol, el 4-*tert*-pentil fenol, podía provocar el desarrollo de oocitos en el interior de los testículos de machos de carpa común, a los 90 días de edad tras la exposición a esta sustancia durante 50 días (de modo que se abarcaba el periodo labil de diferenciación sexual de esta especie). A los 30 días de exposición la concentración más baja utilizada, 0,1 mg/L, relevante desde el punto de vista ambiental, se había desarrollado un oviducto (característico de hembras) en prácticamente todos los machos. Además la exposición al 4-*tert*-pentil fenol resultó en un retraso en el desarrollo de los testículos y en algunos individuos en la formación de ovotestes.

Considerando todo lo anteriormente dicho, el siguiente paso consistió en buscar poblaciones de peces en el medio salvaje en las que se estuviera produciendo una alteración del desarrollo sexual. Tal y como se ha mencionado anteriormente ya a finales de los años setenta se observó, casi por casualidad, la presencia de intersexos en una población de *R. rutilus* en la cuenca del Támesis (Tyler y Routledge, 1998). En un estudio realizado en varios ríos de Inglaterra y en un río de Irlanda



se confirmó la aparición de estas anomalías en machos salvajes de *R. rutilus* (Jobling *et al.*, 1998). Se observó que los machos capturados en ríos contaminados mostraban un mayor porcentaje de intersexos que los capturados en aguas limpias. Además, los porcentajes de intersexo se disparaban en los animales capturados en algunos ríos aguas abajo de los puntos de vertido de depuradoras. Las concentraciones de VTG en los machos de las aguas contaminadas fueron mayores que las de los controles, pero aumentaron todavía más en los animales intersexo, aunque no llegaron a los niveles de las hembras. El número de oocitos y el grado de desarrollo de la intersexualidad varió enormemente de unos animales a otros: desde aquellos en los que aparecía algún oocito aislado entre el tejido gonadal hasta aquellos otros en los que se encontraron secciones claras de tejido ovárico perfectamente diferenciado del tejido testicular (Nolan *et al.*, 2001).

Una vez que se observó que los procesos de disrupción endocrina no sólo afectaban a la inducción de VTG (cuyas implicaciones ecológicas no quedaban claras, como se ha dicho antes) sino que también podían provocar alteraciones importantes en el desarrollo gonadal, cabía preguntarse por las consecuencias a largo plazo sobre la viabilidad de las poblaciones salvajes. En un estudio realizado en el Reino Unido se compararon diferentes variables indicadoras de la eficacia reproductiva entre *R. rutilus* capturados en ríos que recibían vertidos de depuradoras y los capturados en aguas limpias (Jobling *et al.*, 2002a). Se observó que en los ríos contaminados con los vertidos no aparecían machos, sino que junto a las hembras lo que se encontraban eran únicamente intersexos. La intersexualidad se manifestaba de diferentes modos: presencia de oocitos o de tejido ovárico inmersos en el tejido testicular o malformaciones de las gónadas y de los conductos reproductores. En contraste, parecía que el desarrollo de los ovarios en las hembras no se veía especialmente alterado, aunque sí que hubo más atresia en los ovarios de las hembras capturadas en los ríos contaminados que en los de las hembras capturadas en los ríos de referencia. En cualquier caso, el resultado más importante era que la espermatogénesis estaba claramente inhibida en la mayor parte de los animales intersexo. Como resultado, únicamente del 50 al 57 % de los intersexos de los ríos contaminados eran capaces de espermear al ser masajeados en la



época de reproducción, frente a un 100 % de los machos capturados en aguas limpias. Además, la producción de esperma fue menor en los intersexo que en los machos de las aguas limpias, a pesar de que las gónadas alcanzaron tamaños similares. Cuando se estudió la calidad de ese esperma en términos de movilidad y densidad espermática y de eficacia en la fertilización se encontró que esa calidad estaba inversamente relacionada con el grado de feminización del pez (Jobling *et al.*, 2002b). Este trabajo constituye una clara evidencia de la relación entre un efecto causado por contaminantes estrogénicos en peces salvajes y una disminución de la eficacia reproductora de esos peces.

A partir de este estudio, la presencia de intersexos en poblaciones salvajes de peces se ha observado en puntos geográficos distantes y en diferentes especies. En Europa, perturbaciones similares a las descritas se encontraron en el Reino Unido en poblaciones salvajes de gobio (*Gobio gobio*) (Van Aerle *et al.*, 2001). En lenguados (*Platichthys flesus*) capturados en cuatro estuarios diferentes en el Oeste, Este y Norte de Inglaterra se observó que los machos poseían niveles anormalmente altos de VTG (Allen *et al.*, 1999). Además, en uno de los estuarios (el de Mersey) aproximadamente el 20 % de los peces contenían oocitos en sus testículos. En Italia, barbos capturados en el río Po por debajo del punto de confluencia con el río Lambro mostraron gónadas intersexo en un 50 % de los casos, evidenciando que el río Lambro arrastraba disruptores endocrinos, probablemente con actividad estrogénica (Vigano *et al.*, 2001). En aguas mediterráneas también se ha observado la presencia de intersexos en un 25 % de 162 machos de pez espada capturados en barcos comerciales (De Metrio *et al.*, 2003). En sólo dos individuos aparecieron oocitos previtelogénicos perfectamente agrupados en el tejido testicular. En el resto de los individuos se detectaron solamente oocitos aislados. En tres ríos del noroeste de Francia también aparecieron machos de *R. rutilus* con oocitos desarrollándose en el tejido gonadal (Minier *et al.*, 2000). Normalmente estos intersexo aparecieron aguas abajo de depuradoras. En uno de los ríos (el Sena) este fenómeno se observó también en gobio, aunque los resultados no son concluyentes porque se capturó un bajo número de ejemplares (tres en total, uno de los cuales fue intersexo).

En España se ha publicado un caso de intersexo en un macho de un total de siete capturados en el Ebro, aguas abajo de Zaragoza (La-



vado *et al.*, 2004). En seis de los machos se encontró una importante desestructuración del tejido testicular. Además, mediante western-blot se detectó VTG en cuatro de los siete machos. Dado que estas alteraciones aparecieron en las aguas por debajo de Zaragoza los autores sugirieron que podrían ser debidas a la presencia de sustancias estrogénicas en los vertidos de las depuradoras de esta ciudad. Citan en particular altas concentraciones de alquilfenoles y de alquilfenoles polietoxilados detectados en la bilis de carpas recogidas en esta zona (Lavado, 2005). También se han detectado intersexos de carpa en una zona del río Anoia (al noreste de España) (Solé *et al.*, 2003) conocida por estar contaminada con sustancias estrogénicas, tipo alquilfenoles, y estrógenos procedentes del vertido de plantas depuradoras (Petrovic *et al.*, 2002). De un total de 31 machos capturados, seis presentaban tejido ovárico dentro de los testículos.

En Canadá, en una zona al oeste del lago Ontario llamada Cootes Paradise, en el año 1998 no se encontraron anomalías gonadales en juveniles de un invierno de edad de carpín, carpa, *Dorosoma cepedianum*, *Ictalurus ameianus*, *Lepomis gibbosus* y *Lepomis macrochirus* (Kavanagh *et al.*, 2004). Sin embargo, en este mismo estudio en 8 de 16 machos de *Morone americana* se encontraron oocitos inmersos en el tejido testicular. En el año 2000, en la misma localización se llegaron a encontrar un 83 % de individuos intersexo. Además los muestreos se extendieron a otras zonas y en la Bahía de Quinte aparecieron un 22 % y un 44 % de intersexo en los años 1999 y 2000 respectivamente. Por su parte, en el lago «St. Clair» en el año 2000 se observó hasta un 45 % de intersexo. El hecho de que en los machos se diera inducción de VTG (detectada mediante western-blot) resultó indicativo de que las alteraciones observadas en el desarrollo sexual eran debidas probablemente a la presencia de sustancias estrogénicas en las aguas (Kavanagh *et al.*, 2004). También se han encontrado casos de intersexo en esturiones (*Scaphirhynchus platyrhynchus*) capturados en el Misisipi: de 22 esturiones capturados aguas arriba de San Luis, en Misuri, Estados Unidos, 11 fueron machos y 11 hembras, sin embargo, aguas abajo dos de los siete machos capturados (junto a 10 hembras) presentaron desarrollo de tejido ovárico en el testículo (Harshbarger *et al.*, 2000). Los autores relacionaron esta anomalía con la presencia en



los tejidos de los esturiones de diversos compuestos organoclorados, como algunos PCBs y los pesticidas DDE y Clordano. En particular, el Clordano se ha detectado en repetidas ocasiones en los tejidos de los esturiones (Roberts *et al.*, 1991). Los pocos casos de hermafroditismo en esturiones detectados en Estados Unidos lo han sido también en aguas contaminadas, tal y como citan Harshbarger *et al.*, (2000) en su estudio: se describió un caso similar de hermafroditismo en esturión atlántico (*Acipenser oxyrhynchus*) capturado en el río Hudson, en Nueva York, ya en el año 1976 (Atz y Smith, 1976); y otros tres casos se describieron más tarde en la misma localización, siendo asociados a la presencia de PCBs en las aguas (Van Eenennaam y Doroshov, 1998); finalmente, otro caso de intersexo en esturión blanco (*Acipenser transmontanus*) se encontró en la bahía de San Francisco (Chapman *et al.*, 1996).

En la bahía de Tokio se encontraron machos de una especie de lenguado (*Pleuronectes yokohamae*) con niveles anormalmente altos de VTG (hasta 2.200 ng/ml) con respecto a los niveles detectados en machos de una zona control (máximo de 91 ng/ml), mostrando algunos de estos machos oocitos desarrollados en el tejido testicular (Hashimoto *et al.*, 2000).

Hay que tener en cuenta que la mayor parte de los trabajos publicados son aquellos que encuentran resultados «positivos», es decir, un efecto estrogénico claro. No obstante también hay algunos trabajos publicados con resultados negativos. Por ejemplo, en Michigan, Estados Unidos, se llevaron a cabo varios experimentos exponiendo carpines in situ a los vertidos de depuradoras pero no se observaron alteraciones en los niveles plasmáticos de VTG ni de E2 con respecto a los controles (Giesy *et al.*, 2003). Esto llevó a los autores a concluir que el riesgo de exposición estrogénica es reducido en este caso.

8.5.3. Efectos (anti)estrogénicos en poblaciones de peces

Un caso muy estudiado de alteraciones endocrinas en poblaciones salvajes de peces es el debido a los «bleach kraft pulp mill effluents» (BKME), es decir los efluentes de las industrias dedicadas al blanqueo de la pulpa de madera. En los años ochenta, en un estudio patrocini-



nado por la agencia del medio ambiente sueca se observó que los peces capturados en la vecindad de estas factorías mostraban niveles bajos de hormonas sexuales, una reducción del crecimiento gonadal y un retraso en la maduración sexual, todo lo cual sugería que estos animales estaban expuestos a disruptores endocrinos (Andersson *et al.*, 1988; revisado por Vos *et al.*, 2000). En principio se atribuyeron estos efectos al proceso de blanqueado con cloro, que se traduce en la formación y liberación al medio de una gran cantidad de compuestos clorados con estructuras diversas y en muchos casos desconocidas. De hecho, parece que los efectos de estos vertidos son complejos y que hay gran cantidad de mecanismos hormonales implicados. Así al analizar VTG en plasma de percas (*Perca fluviatilis*) capturadas cerca de estas factorías se observó por un lado un efecto estrogénico suave en los machos pero también un cierto efecto antiestrogénico en hembras (Förlin *et al.*, 1999). En Finlandia, en el Lago Saimaa del Sur, también se observó que cuando ejemplares juveniles de *Coregonus lavaretus* se exponían in situ encerrándolos en jaulas a los efluentes de papeleras o de fábricas de pulpa había una inducción de la transcripción de VTG (Mellanen *et al.*, 1999) lo que indica que estos vertidos tienen cierta potencia estrogénica.

En una serie de trabajos llevados a cabo en Ontario, Canadá, se observó que poblaciones salvajes de peces expuestas a los BKME en la bahía Jackfish en el lago Superior mostraban alteraciones importantes en su capacidad reproductora. En esta área el pez *Catostomus commersoni* alcanzaba la madurez sexual a una edad más avanzada de lo normal, presentaba un tamaño gonadal reducido y los caracteres sexuales secundarios se expresaban con menos fuerza de lo debido (McMaster *et al.*, 1992; Munkittrick *et al.*, 1991). Hembras de *C. commersoni* que habían estado expuestas a los BKME presentaban durante el periodo de vitelogénesis niveles anormalmente bajos de E2 y de testosterona (el andrógeno que es transformado en E2 tras un proceso de aromatización). También mostraron una concentración reducida de 17 α ,20 β -dihidroxy-4-pregnen-3-ona (17,20 β P) durante los periodos de prepuesta y puesta (Van der Kraak *et al.*, 1992). Por su parte los machos exhibieron niveles bajos de los esteroides sexuales testosterona, 11-cetotestosterona y 17,20 β P (Munkittrick *et al.*, 1991).



En otras especies expuestas a los BKME en la bahía Jackfish también se observó una reducción de los niveles de esteroides sexuales, por ejemplo en *Coregonus culpeaformis* (Munkittrick *et al.*, 1992). Y el mismo efecto se vio en *C. commersoni* expuesto a los efluentes de papeleras en otros lugares (Gagnon *et al.*, 1994). Además, en una serie de estudios de laboratorio, la exposición a los BKME provocó un retraso del proceso reproductor y una disminución del número de huevos en *Pimephales promelas* (Kovacs *et al.*, 1995). También hubo una reducción en la capacidad de producción de esteroides en carpín expuesto a los BKME tanto en laboratorio como in situ (McMaster *et al.*, 1996). Junto a estos efectos se observó una inducción de la actividad EROD en varias especies de peces (Hodson, 1996).

El efecto de estas alteraciones sobre la capacidad reproductiva quizás se haya hecho más evidente en los trabajos realizados en las fábricas papeleras de Florida. Aquí se observó que hembras de *Gambusia affinis holbrooki* que vivían aguas abajo de los puntos de vertido se habían «masculinizado», de modo que mostraban una elongación de la aleta anal que en los machos forma el gonopodio utilizado para la fertilización interna (Parks *et al.*, 2001). También se observó un proceso de masculinización en otras dos especies: *Heterandria formosa* y *Poecilia latipinna* recogidas en el arroyo Rice, al que llegan los vertidos de la papelera Palatka, en Florida central (Bortone y Cody, 1999). Ejemplares de *Micropterus salmoides* recogidos en el mismo lugar mostraron no sólo una reducción de esteroides sexuales, si no también del índice gonadosomático y de la producción de VTG en hembras (Sepúlveda *et al.*, 2002).

Diversos experimentos intentaron averiguar cual era el mecanismo de acción de estos efluentes. Se hizo evidente que los BKME tenían un efecto muy marcado en diversos puntos del eje hipotálamo-hipofis-gónada ya que junto a la caída en la concentración de los esteroides sexuales en *C. commersoni*, se producía una reducción en los niveles circulantes de hormonas gonadotropas y una disminución en la capacidad de síntesis de esteroides (Van der Kraak *et al.*, 1992). Con el fin de averiguar con exactitud el mecanismo de acción de los BKME se recogieron folículos de hembras de *C. commersoni* en vitelogénesis y se observó que su capacidad de síntesis de testosterona y de E2,



tanto basal como estimulada con gonadotropina coriónica humana se encontraba disminuida (McMaster *et al.*, 1995) lo que indica que estos vertidos ejercen su efecto preponderantemente a nivel de la síntesis de esteroides. También se ha sugerido que la inducción de la actividad EROD observada en ejemplares de *M. salmoides* recogidos por debajo del punto de vertido de una papelera en Florida central estaba relacionada con efectos antiestrogénicos (Sepúlveda *et al.*, 2004), en concordancia con lo observado en diversos experimentos in vivo e in vitro (Anderson *et al.*, 1996a, b; revisión de Navas y Segner, 2006).

Un problema importante en lo relativo a los BKME es que se trata de mezclas muy complejas, con muchos compuestos que ni siquiera han sido identificados, de modo que es difícil establecer las sustancias responsables de los efectos observados. En una serie de estudios in vitro (citados por Vos *et al.*, 2000) se demostró que los efluentes contenían tanto compuestos estrogénicos como compuestos tipo dioxina (que podrían actuar como antiestrogénicos. Ver Navas y Segner, 1998, 2006). En base a las curvas dosis-respuesta se llegó a la conclusión de que los vertidos contenían hasta 20 ppt de TEQs. El hecho de que se haya observado inducción de la actividad EROD (Munkittrick *et al.*, 1994) podría ser indicativo de la presencia de compuestos con estructuras relacionadas con las de las dioxinas. No obstante en los últimos años se ha demostrado la enorme variabilidad estructural de los compuestos activadores del AhR, por lo que es difícil asignar la inducción observada a un compuesto concreto (Denison y Nagy, 2003; Navas *et al.*, 2006). No obstante, algunas pistas sobre la naturaleza de estos compuestos podrían obtenerse del hecho de que a partir de finales de 1993 se observó que los carpines expuestos a los BKME bajo condiciones controladas no veían alterada de una manera tan marcada como antes su capacidad de producción de esteroides y esto coincidió con ciertas modificaciones en los procesos de producción que se introdujeron a mediados de 1993 en la fábrica que estaba siendo observada (McMaster *et al.*, 1996). Aunque la empresa no hizo públicas ni dio explicaciones sobre tales modificaciones.

Junto a los xenobióticos sintéticos estos efluentes contienen una gran cantidad de compuestos naturales que provienen de los árboles. Una de estas sustancias naturales que aparece con una gran abundancia es



el β -sitosterol. Cuando este compuesto se inyectó en carpines provocó una reducción de los niveles de testosterona y de 11-oxo-testosterona en los machos, y de los niveles de testosterona y E2 en las hembras (MacLatchy y Van Der Kraak, 1995). En hembras de *Gambusia affinis* expuestas a los efluentes se observó un proceso de masculinización debido a la transformación bacteriana del β -sitosterol en una hormona androgénica (Denton *et al.*, 1985) o bien debido a la acción de otro esteroide vegetal, el estigmastanol y sus productos de degradación (Howell y Denton, 1989). Sin embargo, y esto da una idea de la complejidad del asunto, el β -sitosterol actúa también como una sustancia estrogénica induciendo la producción de VTG en peces (ver MacLatchy *et al.*, 1997). Al indagar en los mecanismos por los que el β -sitosterol provocaba la reducción en la capacidad de producción de esteroides se observó que causaba alteraciones en la disponibilidad de colesterol para iniciar el proceso de síntesis de los esteroides sexuales y que también afectaba al proceso de transformación de pregnenolona en testosterona (MacLatchy *et al.*, 1997). Todo ello evidenció que este compuesto podía jugar un papel muy importante en los efectos causados por los BKME aunque, evidentemente, otros muchos también estaban actuando.

A pesar del conocimiento que se fue adquiriendo acerca del efecto de estos vertidos en la fisiología de la reproducción se sabía muy poco sobre su influencia en la eficacia reproductora de las especies afectadas. En exposiciones llevadas a cabo en *M. salmoides* durante 56 días con concentraciones de los vertidos que llegaron hasta un 80 % (Sepúlveda *et al.*, 2003) se observó que, a pesar de las modificaciones ya observadas anteriormente en los niveles de hormonas sexuales y VTG, no había ningún efecto sobre la fecundidad, el tamaño de los huevos o las tasas de eclosión. Sin embargo sí que hubo un aumento en la tasa de anomalías observadas en las crías procedentes de los animales expuestos lo que hizo que el crecimiento y supervivencia de las larvas disminuyera significativamente. La importancia ecológica de las alteraciones que se fueron observando fue ya discutida por Davis *et al.*, (1992). Estos autores, en base a los resultados de otros científicos y los suyos propios, sugirieron que efectivamente el proceso reproductor llegaría a verse impedido tras exposiciones prolongadas a los BKME lo que afectaría negativamente al éxito de las poblaciones de peces.



8.6. PERTURBADORES ENDOCRINOS Y PISCICULTURA

La posible influencia de los disruptores endocrinos sobre los peces cultivados no ha sido estudiada como si se tratara de un caso particular. Las razones son evidentes: primero, en un sistema de producción controlado y que ha de ser rentable las acciones preventivas son fundamentales, así que en la explotación se ponen los medios adecuados para que el problema no aparezca; segunda, quizás como consecuencia de esa prevención a la que se acaba de hacer referencia, en la bibliografía no se encuentran casos de efectos de disruptores endocrinos sobre la eficacia reproductiva en las explotaciones piscícolas. No obstante, los disruptores endocrinos pueden llegar a los peces en cultivo y podrían llegar a afectar a la rentabilidad de las explotaciones.

Buena parte de los estudios sobre el efecto estrogénico de algunos xenobióticos en peces parten de una serie de trabajos realizados por Pelissero en el grupo de Françoise Le Menn de la Universidad de Burdeos acerca de los piensos para peces. En principio se observó que los niveles de esteroides sexuales en varias preparaciones comerciales eran relativamente altos (Pelissero *et al.*, 1989): los niveles de E2 alcanzaron 935 ng/100g, los de estrona 615 ng/100g y los de andrógenos 1.100 ng/100 g. Aunque había una enorme variabilidad en las cantidades detectadas de unos piensos a otros e incluso en diferentes lotes del mismo pienso, unos niveles tan altos de esteroides sexuales parecían ser capaces de influir las concentraciones plasmáticas naturales y la producción de VTG. En este mismo trabajo se mostraba que los machos de esturión alimentados con estas dietas tenían unas cantidades anormalmente altas de E2 y de VTG en plasma.

Estos mismos autores se interesaron por el efecto de los fitoestrógenos que podrían aparecer también en los granos de alimento. Como se ha mencionado previamente la actividad hormonal de los fitoestrógenos se observó muy tempranamente al ser la causa de la reducción de fertilidad de ovejas que pastaban tréboles especialmente ricos en estos compuestos (Leavitt y Wright, 1965; Obst y Seamark, 1970). Además de en los tréboles, los fitoestrógenos alcanzan concentraciones muy elevadas en muchas leguminosas como la alfalfa o la soja. Por lo tanto



si estas sustancias pasaran a formar parte de los piensos comerciales, como ocurría en algunos casos (Citado por Pelissero *et al.*, 1991a) en los que la soja formaba una parte esencial del grano, era de esperar que también tuvieran efectos en los peces que recibían ese alimento. En una serie de experimentos utilizando esturiones observaron que los piensos fabricados a base de soja tenía un efecto estrogénico causando la producción de VTG en machos (Pelissero *et al.*, 1991a). La capacidad estrogénica de los fitoestrógenos individuales se evidenció mediante inyecciones intraperitoneales en juveniles de esturiones (Pelissero *et al.*, 1991b). Tanto la daidzeína, como la biocanina A, la genisteína, el ecueol y el cumestrol causaron la producción de VTG, siendo el cumestrol el más potente de todos.

Por lo tanto, la utilización de leguminosas, particularmente soja, como materia prima para la fabricación de piensos puede ser una vía de llegada de sustancias estrogénicas a los peces en cultivo. Hoy por hoy, cuando se baraja la utilización de fuentes de proteínas alternativas a la harina de pescado en los piensos, hay que tomar en cuenta los posibles efectos secundarios de los fitoestrógenos en los animales cultivados.

Pero los piensos también pueden arrastrar sustancias antiestrogénicas, particularmente compuestos relacionados con las dioxinas. En la fabricación de piensos se utilizan harinas de pescado en las que aparecen los compuestos que acumularon los peces a partir de los cuales se obtuvieron esas harinas. En granos de una dieta comercial usada en lubina se han encontrado cantidades perfectamente detectables de varios compuestos organoclorados incluyendo DDT, DDE y varios PCBs (Serrano *et al.*, 2003). Las concentraciones de estos compuestos aumentaban, con respecto a la observada en el pienso, en diversos compartimentos corporales de lubinas, mantenidas en experimentación durante 6 ó 24 meses, o cultivadas, y alimentadas con esos piensos. Puesto que estos compuestos son difícilmente metabolizables por los peces tienden a bioacumularse y biomagnificarse. Los factores de biomagnificación alcanzaron valores de hasta 20, por ejemplo para el PCB180 en grasa visceral (Serrano *et al.*, 2003).

En un estudio sobre la presencia de PCBs, pesticidas organoclorados y PBDEs en piensos utilizados en acuicultura, en aceites de pescado y



en salmón atlántico, *Salmo salar*, salvaje y cultivado, procedente de varios países europeos, aparecieron altas concentraciones de PCBs y niveles moderados de pesticidas organoclorados y PBDEs (Jacobs *et al.*, 2002). Las concentraciones de PCBs fueron 145-460 ng / g de lípido en los salmones, 76-1.153 ng /g de lípido en los piensos para los salmones y 11-218 ng /g de lípido en los aceites de pescado. Los diferentes DDTs presentaron también concentraciones muy variables: 5-250 ng / g de lípido en los salmones; 34-52 ng / g de lípido en los piensos y 11-218 ng / g de lípido en los aceites de pescado. Finalmente los PBDEs tenían concentraciones más bajas: 1-85 ng/ g de lípido en los salmones; 8-24 ng /g de lípido en los piensos y desde no detectados a 13 ng/g de lípido en los aceites de pescado. Por lo tanto el salmón mostró los niveles más altos de los distintos contaminantes considerados, seguido de los piensos y, al final, de los aceites de pescado. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en un estudio holandés (RIVO, 2000). Si se observan las tablas en el estudio de Jacobs *et al.*, (2002) se puede observar que las muestras de salmón cultivado tenían, en general, concentraciones más altas de estos contaminantes que las de salmón salvaje.

En un artículo publicado en Science, Hites *et al.*, (2004a) analizaron el contenido de compuestos organoclorados en más de dos toneladas (en total unas 700 muestras) de salmón cultivado y salvaje. Se determinaron las concentraciones de Mirex, Endrin, Dieldrin, DDT total (es decir, DDT y sus metabolitos, considerando en conjunto los diferentes congéneres posibles), PCBs totales y dioxinas totales entre otros compuestos. En algunos casos las concentraciones medias fueron relativamente altas: más de 10 ng de DDT, casi 100 ng PCBs o más de 50 pg de dioxina por g de peso fresco. Lo que resultó interesante es que al comparar las concentraciones encontradas en salmones salvajes y en salmones cultivados estos últimos presentaron concentraciones significativamente más altas desde un punto de vista estadístico que los salmones salvajes para trece de los compuestos analizados (hexaclorobenceno, Mirex, DDT, Endrin, Dieldrin, diferentes isómeros del Clordano y del Nonaclor, Toxafeno, hepóxido de heptacloro, PCBs y dioxinas). Si se comparaban los salmones salvajes con los cultivados de Europa y Norteamérica (sin incluir Sudamérica) entonces los procedentes de



granja tenían cantidades significativamente más altas de los catorce compuestos analizados (a los anteriormente citados habría que añadir el Lindano) que los salmones salvajes. Además la cantidad de estos contaminantes en los salmones también varió dependiendo de su lugar de procedencia: los de Europa tenían cantidades significativamente mayores de los catorce compuestos analizados que los salmones de Norte y Sudamérica.

Estos autores achacaron las diferencias observadas en las concentraciones de estos compuestos organoclorados entre salmones salvajes y cultivados básicamente a la alimentación recibida. Los salmones cultivados se alimentan con piensos que contienen harinas y aceites de pescado, las cuales se obtienen de peces pelágicos de pequeño tamaño (Naylor *et al.*, 2000). Estos peces acumulan mayor cantidad de compuestos organoclorados cuanto mayor sea el grado de contaminación de las aguas en las que crezcan. Por lo tanto, la mayor concentración de compuestos organoclorados detectados en los salmones europeos estaría reflejando una mayor concentración de estos contaminantes en las aguas en las que se capturaron los peces que sirvieron de base para fabricar las dietas con las que se alimentaron. De hecho, al analizar muestras de pienso se observó que las cantidades de compuestos organoclorados eran mayores en los piensos europeos que en los americanos (Hites *et al.*, 2004).

En un estudio similar los mismos autores (Hites *et al.*, 2004b) se concentraron en los análisis de PBDEs y encontraron resultados semejantes a los observados con los compuestos organoclorados. Los PBDEs mostraban concentraciones significativamente mayores en los salmones cultivados que en los salmones salvajes. Los salmones cultivados europeos tenían concentraciones más altas que los de Norteamérica, estos últimos que los salmones cultivados en Chile y éstos, a su vez, más altas que los salmones salvajes. Al analizar trece muestras de pienso procedentes de diferentes localidades de los tres continentes estudiados no se encontraron diferencias significativas en su contenido de PBDEs, aunque sí que había diferencias significativas entre los piensos de las dos compañías mayoritarias que manufacturan estos piensos. No obstante los autores mantienen la idea de que las diferencias encontradas entre los salmones son debidas a las diferencias en el conte-



nido de PBDEs entre las diferentes dietas con que se alimentaron, y por ende, entre los peces utilizados en la obtención de las harinas y aceites de pescado usados para producir el pienso. La falta de diferencias entre los piensos procedentes de diferentes localidades se justifica por el hecho de que hoy en día el origen del pescado usado en la preparación de esos piensos puede ser diverso y no hay prácticamente limitaciones para su transporte.

Un problema para la interpretación de los resultados de los trabajos citados (Hites *et al.*, 2004 a, b) es que las muestras de salmón cultivado y comercializado procedían de salmones atlánticos, *Salmo salar*, mientras que las muestras de salmón salvaje correspondieron a cinco especies de salmón del pacífico cuyo cultivo es mínimo: *Oncorhynchus keta*, *O. kisutch*, *O. tshawytscha*, *O. gorbuscha* y *O. nerea*.

Ante la posible alarma que pudiera causar su informe, los autores indicaron que a la hora de considerar los posibles efectos nocivos de la ingesta de estos contaminantes con la carne de salmón hay que tener muy en cuenta a su vez los beneficios que se derivan de su alto contenido en ácidos grasos de la serie n-3 (Hamilton *et al.*, 2005).

Los compuestos clorados y bromados a los que se ha hecho referencia en los últimos párrafos podrían estar actuando como disruptores endocrinos causando efectos diversos. Puesto que algunos de los compuestos más tóxicos y activos, como la TCDD, tienen un marcado carácter antiestrogénico se han realizado experimentos dirigidos a evaluar las consecuencias de un fenómeno de antiestrogenicidad originado por xenobióticos en peces cultivados. En el Instituto de Acuicultura de Torre de la Sal (40°N, 0°) se alimentó a lubinas de tres años de edad (en su primer periodo reproductor) durante nueve meses (de noviembre a mayo) con pienso al que se había añadido β NF, un activador del AhR (Navas *et al.*, 2004). Estas lubinas comenzaron la vitelogénesis en octubre y las puestas (cada hembra pone dos ó tres veces en el mismo ciclo reproductor) se alargaron de diciembre a abril. Al analizar las concentraciones plasmáticas de VTG, E2 y LH se vio que las lubinas tratadas mostraron alteraciones importantes con respecto a los controles: en el punto medio del periodo reproductor las concentraciones de E2 y LH fueron significativamente más altas, mientras que la concentración de VTG fue significativamente menor que en los controles. La reducción



en la concentración de VTG se relacionó directamente con un efecto antiestrogénico de la BNF. Los autores sugirieron que la elevación de los niveles de E2 y LH podrían estar relacionados con alteraciones en la tasa de transcripción del gen del ER, que es estrógeno dependiente, alteraciones que llevarían a modificar los procesos de retroalimentación con que los estrógenos regulan la producción y liberación de LH.

Por lo tanto se demostró un efecto directo de estos contaminantes antiestrogénicos en el control hormonal de la reproducción; pero en un caso real las concentraciones de sustancias antiestrogénicas en los piensos distan mucho de la concentración que causó las alteraciones observadas. De hecho, al analizar las concentraciones de PCBs, dioxinas y furanos en hígados de lubinas que habían sido alimentadas con piensos comerciales y que también mostraron niveles elevados de E2 y de LH y bajos de VTG con respecto a lubinas alimentadas con pescado natural, se observó que tales concentraciones eran menores que en los hígados de las lubinas alimentadas naturalmente (Navas *et al.*, 2005). Probablemente las alteraciones observadas estaban más relacionadas con diferencias en los niveles de nutrientes aportados por las distintas dietas.

Puesto que las aguas utilizadas en las explotaciones acuícolas, particularmente continentales, se encuentran, por el propio interés del acuicultor, alejadas de puntos de vertido es difícil a priori que los disruptores endocrinos producto de la actividad humana lleguen a afectar a los peces cultivados. No obstante, las propias conducciones de agua de las piscifactorías o los materiales utilizados en tanques y contenedores podrían estar liberando compuestos con actividad hormonal. Finalmente hay que tener en cuenta que las propias hormonas de los peces, con las altas densidades normalmente utilizadas en las explotaciones, podrían tener efectos no deseados. Sin embargo, y a título de ejemplo, en un trabajo reciente de nuestro laboratorio (resultados no publicados) no se encontraron concentraciones importantes de sustancias estrogénicas en las aguas de salida de tres piscifactorías continentales. Es curioso, sin embargo, que ya en las aguas de entrada de una de ellas se encontraran concentraciones relativamente altas de BPA, probablemente debido al tipo de conducción utilizado. Quizás este sea un punto en el que los acuicultores hayan de poner especial cuidado en el futuro,



sobre todo pensando en el efecto que estas sustancias puedan tener a largo plazo sobre sus poblaciones de reproductores.

Se podría concluir diciendo que los disruptores endocrinos son una realidad, que pueden llegar a afectar a los peces en cultivo y que es algo que hay que tomar en consideración, en particular desde un punto de vista preventivo, aunque hoy por hoy no se hayan dado a conocer casos de efectos masivos o agudos de estos contaminantes en las explotaciones piscícolas.

AGRADECIMIENTOS

Este capítulo se ha escrito en el marco del proyecto RTA 2006-00022-00-00 (Programa Nacional Español de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias) que aborda los temas aquí tratados.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAMS, N.R., 1995 Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *Journal of Animal Science* 73: 1509-1515.
- AHEL, M., J. McEVOY, and W. GIGER, 1993 Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environmental Pollution* 79: 243-248.
- AHERNE, G.W., J. ENGLISH, and V. MARKS, 1985 The role of immunoassay in the analysis of microcontaminants in water samples. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 9: 79-83.
- ALAEI, M., P. ARIAS, A. SJÖDIN, and Å. BERGMAN, 2003 An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment International* 29: 683-689.
- ALLEN, Y., A.P. SCOTT, P. MATTHIESSEN, S. HAWORTH, J.E. THAIN, and S. FEIST, 1999 Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 1791-1800.
- ANDERSON, M.J., H. OLSEN, F. MATSUMURA, and D.E. HINTON, 1996a *In vivo* modulation of 17 β -estradiol-induced vitellogenin synthesis and estrogen receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells by β -naphthoflavone. *Toxicology and Applied Pharmacology* 137: 210-218.
- ANDERSON, M.J., M.R. MILLER, and D.E. HINTON, 1996b *In vitro* modulation of 17- β -estradiol-induced vitellogenin synthesis: Effects of cytochrome P4501A1



- inducing compounds on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells. *Aquatic Toxicology* 34: 327-350.
- ANDERSSON, T., L. FÖRLIN, J. HÄRDIG, and Å. LARSSON, 1988 Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45: 1525-1536.
- ARNOLD, S.F., D.M. KLOTZ, B.M. COLLINS, P.M. VONIER, L.J. GUILLETTE JR, and J.A. McLACHLAN, 1996 Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* 272: 1489-1492.
- ATZ, J.W., and C.L. SMITH, 1976 Hermaphroditism and gonadal teratoma-like growths in sturgeon (*Acipenser*). *Bulletin of the Southern California Academy of Science* 75: 119-126.
- BENNETAU-PELISSERO, C., K. LATONNELLE, A. SÉQUEIRA, and V. LAMOTHE, 2000 Phytoestrogens, endocrine disrupters from food. *Analisis* 28: 763-775.
- BENNETT, E.R., and C.D. METCALFE, 2000 Distribution of degradation products of alkylphenol ethoxylates near sewage treatment plants in the lower great lakes, North America. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 784-792.
- BON, E., U. BARBE, J. NÚÑEZ RODRÍGUEZ, B. CUISSET, C. PELISSERO, J.P. SUMPTER, and F. LeMENN, 1997 Plasma vitellogenin levels during the annual reproductive cycle of the female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): establishment and validation of an ELISA. *Comparative Biochemistry and Physiology* 117B: 75-84.
- BORTONE, S.A., and R.P. CODY, 1999 Morphological masculinization in Poeciliid females from a paper mill effluent receiving tributary of the St. Johns River, Florida, USA. *Bulletin of Environmental Toxicology and Chemistry* 63: 150-156.
- Bromine Science and Environmental Forum. 2003. Total Market Demand. Disponible en: www.bsef.com. Último acceso 24.04.2008.
- BULGER, W.H., R.M. MUCCITELLI, and D. KUPFER, 1978 Studies on the in vivo and in vitro estrogenic activities of methoxychlor and its metabolites. Role of hepatic mono-oxygenase in methoxychlor activation. *Biochemical Pharmacology* 27: 2471-2423.
- CADOGAN, D.F., and C.J. HOWICK, 1996. Plasticizers, pp 258-290 in Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Vol 19, 4th edition, edited by J.I. Kroschwitz and M. Howe-Grant. John Wiley & Sons, New York.
- CALAFAT, A.M., Z. KUKLENYIK, J.A. REIDY, S.P. CAUDILL, J. EKONG, and J.L. NEEDHAM, 2005 Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environmental Health Perspectives* 113: 391-395.
- CARRAGHER, J.F., and J.P. SUMPTER, 1991 The mobilization of calcium from calcified tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced to synthesize vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology* 99A: 169-172.
- CARSON-JURICA, M.A., W.T. SCHRADER, and B.W. O'MALLEY, 1990 Steroid receptor family: structure and functions. *Endocrine Reviews* 11: 201-220.



- CASADO, S., M. ALONSO, B. HERRADÓN, J.V. TARAZONA, and J.M. NAVAS, 2006 Activation of the aryl hydrocarbon receptor by carbaryl: computational evidence of the ability of carbaryl to assume a planar conformation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 3141-3147.
- CHAMBRAUD, B., M. BERRY, G. REDENILH, P. CHAMBON, and E.E. BAULIEU, 1990 Several regions of the human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *Journal of Biological Chemistry* 265: 20686-20691.
- CHANA, A., MA. CONCEJERO, J. DE FRUTOS, M.J. GONZÁLEZ, and B. HERRADÓN, 2002 Computational studies on biphenyl derivatives. Analyses of the conformational mobility, molecular electrostatic potencial, and dipole moment of chlorinated biphenyls: searching for the rationalization of the selective toxicity of polychlorinated biphenyls. *Chemical Research in Toxicology* 15: 1514-1526.
- CHAPMAN, F. A., J.P. VAN EENENNAAM, and S.I. DOROSHOV, 1996 The reproductive condition of white sturgeon, *Acipenser transmontanus*, in San Francisco Bay, California. *Fishery Bulletin* 94: 628-634.
- COLBORN, T., and C. CLEMENT, 1992 Chemically induced alterations in sexual and functional development. Princetown Scientific Publishing, Princetown.
- COLLINS, B.M., J.A. McLACHLAN, and S.F. ARNOLD, 1997 The estrogenic and antiestrogenic activities of phytochemicals with the human estrogen receptor expressed in yeast. *Steroids* 62: 365-372.
- COPELAND, P.A., J.P. SUMPTER, T.K. WALKER, and M. CROFT, 1986 Vitellogenin levels in male and female rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, at various stages of the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology* 83B: 487-493.
- CRIM, L.W., and D.M. EVANS, 1983. Influence of testosterone and/or luteinizing hormone releasing hormone analogue on precocious sexual development in the juvenile rainbow trout. *Biology of Reproduction* 29: 137-142.
- DAVIS, D.L., and S.A. BORTONE, 1992 Effects of kraft mill effluent on the sexuality of fishes: an environmental early warning?, pp. 113-127 in *Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/ Human Connection*, edited by T. Colborn and C. Clement. Princetown Scientific Publishing, Inc, Princetown.
- DE LEEUW, R., H.J.TH. GOOS, and P.G.W.J. VAN OORDT, 1986 The dopaminergic inhibition of the gonadotropin-releasing hormone induced gonadotropin release: an in vitro study with fragments and cell suspensions from pituitaries of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *General and Comparative Endocrinology* 63: 171-177.



- DE METRIO, G., A. CORRIERO, S. DESANTIS, D. ZUBANI, F. CIRILLO, M. DEFLORIO, C.R. BRIDGES, J. EICKERB, J.M. DE LA SERNA, P. MEGALOFONOU, and D.E. KIME, 2003 Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius* L.). *Marine Pollution Bulletin* 46: 358-361.
- DESBROW, C., E.J. ROUTLEDGE, G.C. BRIGHTY, J.P. SUMPTER, and M. WALDOCK, 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical Fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science and Technology* 32: 1549-1558.
- DELESCLOSE, C., N. LEDIRAC, R. LI, M.P. PIECHOCKI, R.N. HINES, X. GIDROL, and R. RAHMANI, 2001. Induction of cytochrome CYP1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells. *Biochemical Pharmacology* 61: 399-407.
- DENISON, M.S., and S.R. NAGY, 2003 Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology* 43: 309-334.
- DENTON, T.E., W.M. HOWELL, J.J. ALLISON, J. MCCOLLUM, and B. MARKS, 1985 Masculinization of female mosquitofish by exposure to plant sterols and *Mycobacterium smegmatis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 35: 627-632.
- DEVITO, M.J., M. XINFANG, J.G. BABISH, M. MENACHE, and L.S. BIRNBAUM, 1994 Dose response relationships in mice following subchronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: CYP1A1, CYP1A2, estrogen receptor and protein tyrosine phosphorylation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 124: 82-90.
- DUFOUR, S., N. DELERUE-LEBELLE, and Y.A. FONTAINE, 1983 Effects of steroid hormones on pituitary immunoreactive gonadotropin in European freshwater eel, *Anguilla anguilla* L. *General and Comparative Endocrinology* 52: 190-197.
- DURANDO, M., L. KASS, J. PIVA, C. SONNENSCHIN, A.M. SOTO, E.H. LUQUE, and M. MUÑOZ DE TORO, 2007 Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environmental Health Perspectives* 115: 80-86.
- ECOBICHON, D.T., and D.O. MACKENZIE, 1974 The uterotrophic activity of commercial and isomerically pure chlorobiphenyls in the rat. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology* 9: 85-95.
- EKELUND, R., A. BERGMAN, A. GRANMO, and M. BERGGREN, 1990 Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals-A re-evaluation. *Environmental Pollution* 64: 107-120.
- ELLIOTT, J.A.K., N.R. BROMAGE, and C. WHITEHEAD, 1979 Effects of estradiol-17 β on serum calcium and vitellogenin levels in rainbow trout. *Journal of Endocrinology* 83: 54P-55P.



- FATOKI, O.S., and F. VERNON, 1990 Phthalate esters in rivers on the Greater Manchester area, UK. *Science of the Total Environment* 95: 227-232.
- FIEDLER, H., 1993 Formation and sources of PCDDs/PCDFs. *Organohalogen Compounds, Dioxin* 93 11: 221-228.
- FOLMAR, L.C., N.D. DENSLOW, V. RAO, M. CHOW, D.A. CRAIN, J. ENBLUM, J. MARCINO, and L.J. GUILLETTE, 1996 Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations on feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environmental Health Perspectives* 104: 1096-1101.
- FOSSI, M.C., C. CASINI, S. ANCORA, A. MOSCATELLI, A. AUSILI, and G. NOTARBARTOLO DI SCIARA, 2001 Do endocrine disrupting chemicals threaten Mediterranean swordfish?. Preliminary results of vitellogenin and zona radiata proteins in *Xiphias gladius*. *Marine Environmental Research* 52: 477-483.
- FOSTIS, T., 1987 The multicomponent analysis of estrogens in urine by ion exchange chromatography and GC-MS-II. Fractionation and quantitation of the main groups of estrogen conjugates. *Journal of Steroid Biochemistry* 28: 215-226.
- GAGNON, M.M., J.J. DODSON, and P.V. HODSON, 1994 Seasonal effects of bleached kraft mill effluent on reproduction parameters of white sucker (*Catostomus commersoni*) populations of the St. Maurice River, Quebec, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51: 337-347.
- GIESY, J.P., E.M. SNYDER, K.M. NICHOLS, S.A. SNYDER, S.A. VILLALOBOS, P.D. JONES, and S.D. FITZGERALD, 2003 Examination of reproductive endpoints in goldfish (*Carassius auratus*) exposed in situ to municipal sewage treatment plant effluent discharges in Michigan, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 2416-2431.
- GIMENO, S., A. GERRITSEN, T. BOWMER, and H. KOMEN, 1996. Feminization of male carp. *Nature* 384: 221-222.
- HALE, R.C., M.J. LA GUARDIA, E.P. HARVEY, M.O. GAYLOR, T.M. MAINOR, and W.H. DUFF, 2001 Flame retardants: Persistent pollutants in land-applied sludges. *Nature* 412: 140-141.
- HALE, R.C., M.J. LA GUARDIA, E. HARVEY, M. MAINOR, 2002 Potential role of fire retardant-treated polyurethane foam as a source of brominated diphenyl ethers to the US environment. *Chemosphere* 46: 729-735.
- HAMILTON, M.C., R.A. HITES, S.J. SCHWAGER, J.A. FORAN, B.A. KNUTH, and D.O. CARPENTER, 2005 Lipid composition and contaminants in farmed and wild salmon. *Environmental Science and Technology* 39: 8622-8629.
- HARRIES, J.E., D.A. SHEAHAN, S. JOBLING, P. MATTHIESSEN, P. NEALL, E.J. ROUTLEDGE, R. RYCROFT, J.P. SUMPTER, and T. TYLOR, 1996 A survey of estrogenic activity in



- United Kingdom inland waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 1993-2002.
- HARRIES, J.E., D.A. SHEAHAN, S. JOBLING, P. MATTHIESSEN, P. NEALL, J.P. SUMPTER, T. TAYLOR, and N. ZAMAN, 1997 Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 534-542.
- HARRIS, C.A., P. HENTTU, M.G. PARKER, and J.P. SUMPTER, 1997 The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environmental Health Perspectives* 105: 802-810.
- HARSHBARGER, J.C., M.J. COFFEY, and M.Y. YOUNG, 2000 Intersexes in Mississippi river shovelnose sturgeon sampled below Saint Louis, Missouri, USA. *Marine Environmental Research* 50: 247-250.
- HASHIMOTO, S., H. BESSHO, A. HARA, M. NAKAMURA, T. IGUCHI, and K. FUJITA, 2000 Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environmental Research* 49: 37-53.
- HERMAN, R.L., and H.L. KINCAID, 1988 Pathological effects of orally administered estradiol to rainbow trout. *Aquaculture* 72: 165-172.
- HITES, R.A., 2004 Polybrominated diphenyl ethers in the environment and in people: A meta-analysis of concentrations. *Environmental Science and Technology* 38: 945-956.
- HITES, R.A., J.A. FORAN, D.O. CARPENTER, M.C. HAMILTON, B.A. KNUTH, and S.J. SCHWAGER, 2004a Global assessment of organic contaminants in farmed salmon. *Science* 303: 226-229.
- HITES, R.A., J.A. FORAN, S.J. SCHWAGER, B.A. KNUTH, M.C. HAMILTON, and D.O. CARPENTER, 2004b Global assessment of polybrominated diphenyl ethers in farmed and wild salmon. *Environmental Science and Technology* 38: 4945-4949.
- HOAR, W.S. and Y. NAGAHAMA, 1978 The cellular sources of sex steroids in teleost gonads. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 18: 893-898.
- HODSON, P.V., 1996 Mixed function oxygenase induction by pulp mill effluents: advances since 1991, pp. 349-358 in *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, edited by M.R. Servos, K.R. Munkittrick, J.H. Carey and G.J. Van Der Kraak. St. Lucie Press, Delray Beach.
- HOWELL, W.M., and T.E. DENTON, 1989 Gonopodial morphogenesis in female mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*, masculinized by exposure to degradation products from plant sterols. *Environmental Biology of Fishes* 24: 43-51.
- JAGA, K., and CH. DHARMANI, 2003 Global Surveillance of DDT and DDE levels in human tissues. *International Journal of Occupational and Environmental Health* 16: 7-20.



- JACOBS, M.N., A. COVACI, and P. SCHEPENS, 2002 Investigation of selected persistent organic pollutants in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*), salmon aquaculture feed, and fish oil components of the feed. *Environmental Science and Technology* 36: 2797-2805.
- JOBLING, S., D. SHEAHAN, J.A. OSBORNE, P. MATTHIESSEN, and J.P. SUMPTER, 1996 Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 194-202.
- JOBLING, S., M. NOLAN, C.R. TYLER, G. BRIGHTY, and J.P. SUMPTER, 1998 Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology* 32: 2498-2506.
- JOBLING, S., N. BERESFORD, M. NOLAN, T. TODGERS-GRAY, G.C. BRIGHTY, J.P. SUMPTER, and C.R. TYLER, 2002 Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biology of Reproduction* 66: 272-281.
- KAGAWA, H., K. GEN, K. OKUZAWA, and H. TANAKA, 2003 Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*. *Biology of reproduction* 68: 1562-1568.
- KAH, O., 1986 Central regulation of reproduction in teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2: 25-34.
- KAVANAGH, R.J., G.C. BALCH, Y. KIPARISIS, A.J. NIIMI, J. SHERRY, C. TINSON, and C.D. METCALFE, 2004 Endocrine disruption and altered gonadal development in white perch (*Morone Americana*) from the lower great lakes region. *Environmental Health Perspectives* 112: 898-902.
- KAVLOCK, R.J., G.P. DASTON, C. DEROSA, P. FENNER-CRISP, L.E. GRAY, S. KAATARI, G. LUCIER, M. LUSTER, M.J. MAC, C. MAZKA, R. MILLER, J. MOORE, R. ROLLAND, G. SCOTT, D. SHEEHAN, T. SINKS, H.A. TILSON, 1996 Research needs for the risk assessment of endocrine disruptors: a report of the US-EPA sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* 102 (Suppl. 4): 715-740.
- KELLY, T.J., J.M. CZUCZURA, P.R. STICKSEL, G.M. SVERDRUP, P.J. KOVAL, and R.F. HODANBOSI, 1991 Atmospheric and tributary inputs of toxic substances to Lake Erie. *Journal of Great Lakes Research* 17: 504-516.
- KNIGHTS, W.M., 1980 Estrogens administered to food-producing animals: environmental consideration, pp. 391-401 in *Estrogens in the Environment*, edited by J.A. McLachlan. North Holland, Amsterdam.
- KOVACS, T.G., J.S. GIBBONS, L.A. TREMBLAY, B.I. O'CONNOR, P.H. MARTEL, and R.H. VOSS, 1995 The effects of a secondary treated bleached kraft mill effluent



- on aquatic organisms as assessed by short term and long-term laboratory test. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 31: 7-22.
- KRISHNAN, A.V., and S. SAFE, 1993 Polychlorinated biphenyls (PCB), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology* 120: 55-61.
- KRISHNAN, A.V., P. STATHIS, S.F. PERMUTH, L. TOKES, and D. FELDMAN, 1993 Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132: 2279-2286.
- KUCH, H.M., and K. BALLSCHMITER, 2001 Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HR-GC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environmental Science and Technology* 35: 3201-3206.
- LATONNELLE, K., F. LE MENN, S.J. KAUSHIK, and C. BENNETAU-PELISSERO, 2002 Effects of dietary phytoestrogens in vivo and in vitro in rainbow trout and Siberian sturgeon: Interests and limits of the in vitro studies of interspecies differences. *General and Comparative Endocrinology* 126: 39-51.
- LAVADO, R., 2005. Disruptores endocrinos en el medio ambiente: mecanismos de acción y efectos sobre la fauna acuática. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, Barcelona.
- LAVADO, R., R. THIBAUT, D. RALDÚA, R. MARTÍN, and C. PORTE, 2004 First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196: 247-257.
- LE GUÉVEL, R., and F. PAKDEL, 2001 Streamlined β -galactosidase assay for analysis of recombinant yeast response to estrogens. *BioTechniques* 30: 1000-1004.
- LEAVITT, W.W., and P.A. WRIGHT, 1965 The plant estrogen coumestrol as an agent affecting hypophysial gonadotropic function. *Journal of Experimental Zoology* 160: 319-327.
- LIN, H.R., G. VAN DER KRAAK, X.J. ZHOU, J.Y. LIANG, R.E. PETER, J.E. RIVIER, and W.W. VALE, 1988 Effects of [D-Arg⁶, Trp⁷, Leu⁸, Pro⁹ NEt]-luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH-A) and [D-Ala⁶, Pro⁹ NEt]-luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH-A), in combination with pimozide or domperidone, on gonadotropin release and ovulation of the Chinese loach and common carp. *General and Comparative Endocrinology* 69: 31-40.
- MACLATCHY, D.L., and G.J.V. VAN DER KRAAK, 1995 The phytoestrogen β -sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish. *Toxicology and Applied Pharmacology* 134: 305-312.



- MACLATCHY, D.L., L. PETERS, J. NICKLE, and J.G. VAN DER KRAAK, 1997 Exposure to β -sitosterol alters the endocrine status of goldfish differently than 17 β -estradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1895-1904.
- McKINNEY, J.D., and C.L. WALLER, 1994 Polychlorinated biphenyls as hormonally active structural analogues. *Environmental Health Perspectives* 102: 290-297.
- McMASTER, M.E., C.B. PORTT, K.R. MUNKITTRICK, and D.G. DIXON, 1992 Milt characteristics, reproductive performance, and larval survival and development of white sucker exposed to bleached kraft mill effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 23: 103-117.
- McMASTER, M.E., G.J. VAN DER KRAAK, and K.R. MUNKITTRICK, 1995 Exposure to bleached kraft pulp mill effluent reduces the steroid biosynthetic capacity of white sucker ovarian follicles. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112C: 169-178.
- McMASTER, M.M., K.R. MUNKITTRICK, G.J. VAN DER KRAAK, P.A. FLETT, and M.R. SERVOS, 1996 Detection of steroid hormone disruptions associated with pulp mill effluent using artificial exposures of goldfish, pp. 425-437 in *Environmental Fate and Effects of Pulp and Paper Mill Effluents*, edited by M.R. Servos, K.R. Munkittrick, J.H. Carey and G.J. Van Der Kraak. St. Lucie Press, Delray Beach.
- MELLANEN, P., M. SOIMASUO, B. HOLMBOM, A. OIKARI, and R. SANTTI, 1999 Expression of the vitellogenin gene in the liver of juvenile whitefish (*Coregonus lavaretus* L. s.l.) exposed to effluents from pulp and paper mills. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43: 133-137.
- MERCHANT, M., V. KRISHNAN, and S. SAFE, 1993 Mechanism of action of α -naphthoflavone as an Ah receptor antagonist in MCF-7-human breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 120: 179-185.
- MINIER, C., G. CALTOT, F. LÉBOULANGER, and E.M. HILL, 2000 An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex regions. *Analisis* 28: 801-806.
- MOMMSEN, T.P., and P.J. WALSH, 1988 Vitellogenesis and oocyte assembly, pp. 347-406 in *Fish Physiology*, vol. XIA, edited by W.S. Hoar and D.J. Randall. Academic Press, San Diego.
- MUNKITTRICK, K.R., C.B. PORTT, G.J. VAN DER KRAAK, I.R. SMITH, and D. ROKOSH, 1991 Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48: 1371-1380.
- MUNKITTRICK, K.R., M.E. McMASTER, C.B. PORTT, G.J. VAN DER KRAAK, I.R. SMITH, and D.G. DIXON, 1992 Changes in maturity, plasma sex steroid levels, hepatic



- mixed-function oxygenase activity, and the presence of external lesions in lake whitefish (*Coregonus culpeaformis*) exposed to bleached kraft mill effluent. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 49: 1560-1569.
- MUNKITTRICK, K.R., M.R. SERVOS, K. GORMAN, B. BLUNT, M.E. McMASTER, and G.J. VAN DER KRAAK, 1994 Characteristics of EROD induction associated with exposure to pulp mill effluent. 4th Symposium on Environmental Toxicology and Risk Assessment, American Society for Testing and Materials, Montreal, Quebec, April 11-13, 1994.
- MUÑOZ-DE-TORO, M., C. MARKEY, P.R. WADIA, E.H. LUQUE, B.S. RUBIN, C. SONNENSCHNEIN and A.M. SOTO, 2005. Perinatal exposure to bisphenol A alters peripubertal mammary gland development in mice. Endocrinology 146: 4138-4147.
- NADAL, A., A.B. ROPERO, O. LARIBI, M. MAILLET, E. FUENTES, and B. SORIA, 2000 Non-genomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor α and estrogen receptor β . Proceedings of the National Academy of Sciences 97: 11603-11608.
- NAKADA, N., H. NYUNOYA, M. NAKAMURA, A. HARA, T. IGUCHI, and H. TAKADA, 2004 Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. Environmental Toxicology and Chemistry 23: 2807-2315.
- NAVAS, J.M., and H. SEGNER, 1998 Antiestrogenic activity of anthropogenic and natural chemicals. Environmental Science and Pollution Research 5: 75-82.
- NAVAS, J.M., and H. SEGNER, 2000 Antiestrogenicity of β -naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the aryl hydrocarbon receptor. Aquatic Toxicology 51: 79-92.
- NAVAS, J.M., and H. SEGNER, 2006 Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for in vitro screening of the (anti)estrogenic activity of chemical substances. Aquatic Toxicology 80: 1-22.
- NAVAS, J.M., I. ANGLADE, T. BAILHACHE, F. PAKDEL, B. BRETON, P. JÉGO, and O. KAH, 1995 Do gonadotrophin-releasing hormone neurons express estrogen receptors in the rainbow trout?. A double immunohistochemical study. The Journal of Comparative Neurology 363: 461-474.
- NAVAS, J.M., E. MAÑANÓS, J. RAMOS, S. ZANUY, M. CARRILLO, M. THRUSH, J. ZOHAR, and N. BROMAGE, 1998 Effect of dietary lipid composition on vitellogenin, 17 β -estradiol and gonadotropin plasma levels and spawning performance in captive sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). Aquaculture 165: 65-79.
- NAVAS, J.M., S. ZANUY, H. SEGNER, and M. CARRILLO, 2004 β -naphthoflavone alters normal plasma levels of vitellogenin, 17 β -estradiol and luteinizing hormone in sea bass broodstock. Aquatic Toxicology 67: 337-345.
- NAVAS, J.M., R. MERINO, B. JIMÉNEZ, J. RIVERA, E. ABAD, S. ZANUY, and M. CARRILLO, 2005 Organochlorine compounds in liver and concentrations of vitellogenin



- and 17 β -estradiol in plasma of sea bass fed with a commercial or with a natural diet. *Aquatic Toxicology* 75: 306-315.
- NAYLOR, R.L., R.J. GOLDBURG, J.H. PRIMAVERA, N. KAUTSKY, M.C.M. BEVERIDGE, J. CLAY, C. FOLKES, J. LUBCHENCO, H. MOONEY, and M. TROELL, 2000 Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature* 405: 1017-1024.
- NESARETNAM, K., and P. DARBRE, 1997 3,5,3',5'-tetrachlorobiphenyl is a weak oestrogen agonist in vitro and in vivo. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 62: 409-418.
- NESARETNAM, K., D. CORCORAN, R.R. DILS, and P. DARBRE, 1996 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl acts as an estrogen in vitro and in vivo. *Molecular endocrinology* 10: 923-936.
- NIVEN, S.J., J. SNAPE, M. HETHERIDGE, M. EVANS, J. McEVOY, P.G. SUTTON, and S.J. ROWLAND, 2001. Investigations of the origins of estrogenic A-ring aromatic steroids in UK sewage treatment works effluents. *Analyst* 126: 285-287.
- NOLAN, M., S. JOBLING, J.P. SUMPTER, G. BRIGHTY, and C.R. TYLER, 2001 A histological description of intersexuality in the roach (*Rutilus rutilus*). *Journal of Fish Biology* 48: 160-176.
- OBST, J.M., and R.F. SEAMARK, 1970 Plasma progesterone concentrations during the reproductive cycle of ewes grazing yarloop clover. *Journal of Reproduction and Fertility* 21: 545-547.
- OHTAKE, F., K. TAKEYAMA, T. MATSUMOTO, H. KITAGAWA, Y. YAMAMOTO, K. NOHARA, C. TOHYAMA, A. KRUST, J. MIMURA, P. CHAMBON, J. YANAGISAWA, Y. FUJII-KURIYAMA, and S. KATO, 2003 Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423: 454-550.
- PAKDEL, F., and B.S. KATZENELLENBOGEN, 1992 Human estrogen receptor mutants with altered estrogen and antiestrogen ligand discrimination. *Journal of Biological Chemistry* 267: 3429-3437.
- PARKS, L.G., C.S. LAMBRIGHT, E.F. ORLANDO, L.J. GUILLETTE JR., G.T. ANKLEY, and L.E. GRAY JR., 2001 Masculinization of female mosquitofish in kraft mill effluent-contaminated Fenholoway river water associated with androgen receptor agonist activity. *Toxicological Sciences* 62: 257-267.
- PECK, M., R.W. GIBSON, A. KORTENKAMP, and E.M. HILL, 2004 Sediments are major sinks of steroidal estrogens in two United Kingdom rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 945-952.
- PELISSERO, C., B. CUISET and F. LE MENN, 1989 The influence of sex steroids in commercial fish meals and fish diets on plasma concentration of estrogens and vitellogenin in cultured Siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *Aquatic Living Resources* 2: 161-168.



- PELISSERO, C., B. BENNETAU, P. BABIN, F. LE MENN, and J. DUNOGUES, 1991a The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 38: 293-299.
- PELISSERO, C., F. LE MENN, and S. KAUSHIK, 1991b Estrogenic effect of dietary soya bean meal on vitellogenesis in cultured siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *General and Comparative Endocrinology* 83: 447-457.
- PETER, R.E., 1983 The brain and neurohormones in teleost production, pp. 97-135 in *Fish Physiology. Reproduction, Part A*, edited by D.J. Randall and E.M. Donaldson. Academic Press, New York.
- PETER, R.E., and K.L. YU, 1997 Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7: 173-197.
- PETIT, F., P. LE GOFF, J-P. CRAVEDI, Y. VALOTAIRE, and F. PAKDEL, 1997 Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. *Journal of Molecular Endocrinology* 19: 321-335.
- PETROVIC, M., M. SOLÉ, M.J. LÓPEZ DE ALDA, and D. BARCELÓ, 2002 Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 2146-2156.
- PICARD, K., J-C. LHUGUENOT, M-C. LAVIER-CANIVENC, and M-C. CHAGNON, 2001 Estrogenic activity and metabolism of N-butyl benzyl ftalato in vitro: identification of the active molecule(s). *Toxicology and Applied Pharmacology* 172: 108-118.
- PIFERRER, F., 2001 Endocrine sex control strategies for the feminization of telost fish. *Aquaculture* 197: 229-281.
- PURDOM, C.E., P.A. HARDIMAN, V.J. BYE, N.C. ENO, C.R. TYLER, and J.P. SUMPTER, 1994 Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works *Chemical Ecology* 8: 275-285.
- RATHNER, M., and M. SONNEBORN, 1979 Biologisch wirksame östrogene in trink- und abwasser. *Forum Städte-Hygiene* 30: 45-49.
- REIS-HENRIQUES, M.A., M.M. CRUZ, and J.O. PEREIRA, 1997 The modulating effect of vitellogenin on the synthesis of 17-beta-estradiol by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary. *Fish Physiology and Biochemistry* 16: 181-186.
- RENNER, R., 1997 European bans on surfactant trigger transatlantic debate. *Environmental Science and Technology* 31: 316-320.
- RIPPEN, G., 1999 Handbuch Umweltchemikalien. Stoffdaten, Prüferfahren, Vorschriften, 3rd ed. 49th supplement issue. Ecomed., Landsberg.
- RIVO Fisheries Institute of Holland, 2000 Report-C034/00



- ROUTLEDGE, E., and J.P. SUMPTER, 1997 Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 3280-3288.
- ROBERTS, D.W., R.G. EVANS, A. MURGUEYTIO, G.M. CARLSON, H.C. CHASKI, K.L. CHERRYHOLMES, G.M. BREUER, V.W. BURSE, M.P. KORVER, L.L. NEEDHAM, and J.R. CRELLIN, 1991 Missouri chlordane exposure study: a report on persons who consume chlordane contaminated fish. Department of Health, Division of Environmental Health and Epidemiology, Jefferson City.
- ROWLANDS, J.C., and J.A. GUSTAFSSON, 1997 Aryl hydrocarbon receptor mediated signal transduction. *Critical Reviews in Toxicology* 27: 109-134.
- RUTISHAUSER, B.V., M. PESONEN, B.I. ESCHER, G.E. ACKERMANN, H-R. AERNI, M.J-F. SUTER, and R.I.L. EGGEN, 2004 Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 857-864.
- SAFE, S., 1990 Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Critical Reviews in Toxicology* 21: 51-88.
- SAFE, S., 1994 Dietary and environmental estrogens and antiestrogens and their possible role in human disease. *Environmental Science and Pollution Research* 1: 29-33.
- SAFE, S., 1995 Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related compounds. *Pharmacology and Therapeutics* 67: 247-281.
- SCHLENK, D., D.M. STRESSER, J. RIMOLDI, L. ARCAND, J. McCANTS, A.C. NIMROD, and W.H. BENSON, 1998 Biotransformation and estrogenic activity of methoxychlor and its metabolites in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Marine Environmental Research* 46: 159-162.
- SEPÚLVEDA, M.S., W.E. JOHNSON, J.C. HIGMAN, N.D. DENSLOW, T.R. SCHOEB, and T.S. GROSS, 2002. An evaluation of biomarkers of reproductive function and potential contaminant effects in Florida largemouth bass (*Micropterus salmoides floridanus*) sampled from the St. Johns River. *Science of the Total Environment* 289: 133-144.
- SEPÚLVEDA, M.S., B.P. QUINN, N.D. DENSLOW, S.E. HOLM, and T.S. GROSS, 2003 Effects of pulp and paper mill effluents on reproductive success of largemouth bass. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 205-213.
- SEPÚLVEDA, M.S., E.P. GALLAGHER, C.M. WIESER, and T.S. GROSS, 2004 Reproductive and biochemical biomarkers in largemouth bass sampled downstream of a pulp and paper mill in Florida. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57: 431-440.



- SERRANO, R., A. SEIMAL-JULIÁN, E. PITARCH, and F. HERNÁNDEZ, 2003 Biomagnification study on organochlorine compounds in marine aquaculture: the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as a model. *Environmental Science and Technology* 37: 3375-3381.
- SHARMAN, M., W.A. READ, L. CASTLE, and J. GILBERT, 1994 Levels of di-(2-ethylhexyl) phthalate and total phthalate esters in milk, cream, butter and cheese. *Food Additive Contamination* 11: 375-385.
- SHAW, T., 1994 Agricultural chemicals in raw wool and the wool textile industry. *Journal of the Institution of Water and Environmental Management* 8: 287-290.
- SHEAHAN, D.A., D. BUCKE, P. MATTHIESSEN, J.P. SUMPTER, M.F. KIRBY, P. NEALL, and M. WALDOCK, 1994 The effects of low levels of 17 α -ethynylestradiol upon plasma vitellogenin levels in male and female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) held at two acclimation temperatures, pp. 99-112 in *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*, edited by R. Müller and R. Lloyd. Fishing News Books, Oxford.
- SHORE, L.S., M. SHEMESH, and R. COHEN, 1988. The role of oestradiol and oestrone in chicken manure silage in hyperoestrogenism in cattle. *Australian Veterinary Journal* 65: 68
- SHORE, L.S., M. GUREVITZ, and M. SHEMESH, 1993 Estrogen as an environmental pollutant. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 51: 361-366.
- SJÖDIN, A., E. JAKOBSSON, A. KIERKEGAARD, G. MARSH, and U. SELLSTRÖM, Gas chromatographic identification and quantification of polybrominated diphenyl ethers in a commercial product, Bromkal 70-5DE. *Journal of Chromatography A* 822: 83-89.
- SOLÉ, M., D. RALDÚA, F. PIFERRER, D. BARCELO, and C. PORTE, 2003 Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comparative Biochemistry and Physiology* 136C: 145-156.
- SPECKER, J.L., and C.V. SULLIVAN, 1994 Vitellogenesis in fishes: status and perspectives, pp. 304-315 in *Perspectives in Comparative Endocrinology*, edited by K.G. Davey, R.E. Peter, and S.S. Tobe. National Research Council of Canada, Ottawa.
- SPERRY, T.S., and P. THOMAS, 1999. Identification of two nuclear androgen receptors in kelp bass (*Paralabrax clathratus*) and their binding affinities for xenobiotics: comparison with Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) androgen receptors. *Biology of Reproduction* 61: 1152-1161.
- STACHEL, B., U. EHRHORN, O-P. HEEMKEN, P. LEPOM, H. REINCKE, G. SAWAL, and N. THEOBALD, 2003 Xenoestrogens in the river Elbe and its tributaries. *Environmental Pollution* 124: 497-507.



- SUMPTER, J.P. and A.P. SCOTT, 1989 Seasonal variations in plasma and pituitary levels of gonadotrophin in males and females of two strains of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). General and Comparative Endocrinology 75: 376-388.
- SUMPTER, J.P., S. JOBLING, and C.R. TYLER, 1996 Oestrogenic substances in the aquatic environment and their potential impact on animals, particularly fish, pp. 205-224 in Toxicology of Aquatic Pollution, edited by E.W. Taylor. Cambridge University Press.
- SWANSON, P., 1991 Salmon gonadotropins: reconciling old and new ideas, pp. 2-7 in Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, edited by A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime and M.S. Rolfe. Fish Symposium 91, Sheffield.
- TAKANO, H., R. YANAGISAWA, K-I. INOUE, T. ICHINOSE, K. SADAKANE, T. YOSHIKAWA, 2006 Di-(2-ethylhexyl)phthalate enhances atopic dermatitis-like skin lesions in mice. Environmental Health Perspectives 114: 1266-1269.
- TAO, Y., A. HARA, R.G. HODSON, L.C. WOODS III, and C.V. SULLIVAN, 1993 Purification, characterization and immunoassay of striped bass (*Morone saxatilis*) vitellogenin. Fish Physiology and Biochemistry 12: 31-46.
- THEELEN, R.M.C., A.K.D. LIEM, W. SLOB and J.H. VAN WIJNEN, 1993 Intake of 2,3,7,8 chlorine substituted dioxins, furans and planar PCBs from food in The Netherlands: median and distribution. Chemosphere 27: 1625-1635.
- TRUDEAU, V.L., C.K. MURTHY, H.R. HABIBI, B.D. SLOLEY, and R.E. PETER, 1993 Effects of sex steroid treatments on gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin secretion from the goldfish pituitary. Biology of Reproduction 48: 300-307.
- TSAI, M-J., and B.W. O'MALLEY, 1994 Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. Annual Review of Biochemistry 63: 451-486.
- TYLER, C.R., and E.J. ROUTLEDGE, 1998 Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. Pure and Applied Chemistry 70: 1795-1804.
- TYLER, C.R., J.P. SUMPTER, H. KAWAUCHI, and P. SWANSON, 1991 Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology 84: 291-299.
- TYLER, C.R., B. VAN DER EERDEN, S. JOBLING, G. PANTER, and J.P. SUMPTER, 1996 Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals in a wide variety of cyprinid fish. Journal of Comparative Physiology 166B: 418-426.
- TYLER, C.R., R. VAN AERLE, T.H. HUTCHINSON, S. MADDIX, and H. TRIP, 1999 An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. Environmental Toxicology and Chemistry 18: 337-347.



- TZUKERMAN, M.T., A. ESTY, D. SANTISO-MEERE, P. DANIELAN, M.G. PARKER, R.B. STEIN, J.W. PIKE, and D.P. McDONNELL, 1994 Human estrogen receptor transactivation capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Molecular Endocrinology* 8: 21-30.
- U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Register, 2002. Toxicological profile for DDT, DDE and DDD. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>. Último acceso 24.04.2008.
- VAN AERLE, R., M. NOLAN, S. JOBLING, L.B. CHRISTIANSEN, J.P. SUMPTER, and C.R. TYLER, 2001 Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2841-2847.
- VAN DER KRAAK G.J., K.R. MUNKITTRICK, M.E. McMASTER, C.B. PORTT, and J.P. CHANG, 1992 Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *Toxicology and Applied Pharmacology* 115: 224-223.
- VAN EENENNAAM, J.P., and S.I. DOROSHOV, 1998 Effects of age and body size on gonadal development of Atlantic sturgeon. *Journal of Fish Biology* 53: 624-637.
- VIGANO, L., A. ARILLO, S. BOTTERO, A. MASSARI, and A. MANDICH, 2001 First observation of intersex cyprinids in the Po River (Italy). *Science of the Total Environment* 269: 189-194.
- VOS, J.G., E. DYBING, H.A. GREIM, O. LADEFOGED, C. LAMBRÉ, J.V. TARAZONA, I. BRANDT, A.D. VETHAAK, 2000 Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology* 30: 71-133.
- WALLACE, R.A., and K. SELMAN, 1990 Ultrastructural aspects of oogenesis and oocyte growth in fish and amphibians. *Journal of Electron Microscopy Technique* 16: 175-201.
- WALLER, C.L., and J.D. MCKINNEY, 1995 Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of dioxins and dioxin-like compounds: Model validation and Ah receptor characterization. *Chemical Research in Toxicology* 8: 847-858.
- WHITE, R., S. JOBLING, S.A. HOARE, J.P. SUMPTER, and M.G. PARKER, 1994 Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135: 175-182.
- YEN, F.-P., Y.-H. LEE, C.-L. HE, J.-D. HUANG, L.-T. SUN, S. DUFOUR, and C.-F. CHANG, 2002 Estradiol-17 β triggers luteinizing hormone release in the protandrous black porgy (*Acanthopagrus schlegelii* Bleeker) through multiple interactions



with gonadotropin-releasing hormone control. *Biology of Reproduction* 66: 251-257.

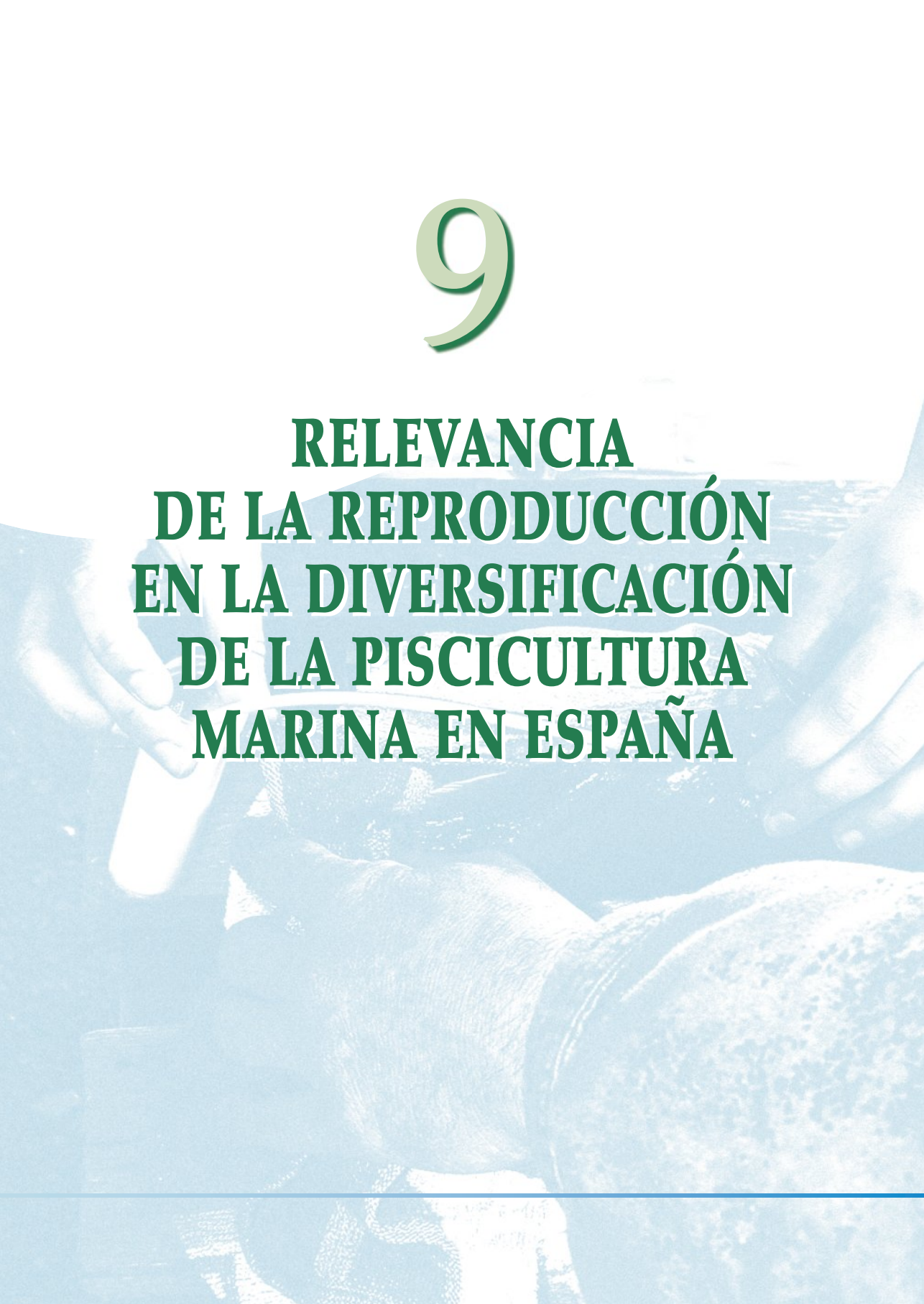
ZACHAREWSKI, T.R., K.L. BONDY, P. McDONELL, and Z.F. WU, 1994 Antiestrogenic effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on 17 β -estradiol-induced pS2 expression. *Cancer Research* 54: 2707-2713.

ZALCO, D., A.M. SOTO, L. DOLO, C. DORIO, E. RATHAHAO, L. DEBRAUWER, R. FAUER, and J.P. CRAVEDI, 2003 Biotransformations of bisphenol A in a mammalian model: answers and new questions raised by low-dose metabolic fate studies in pregnant CD1 mice. *Environmental Health Perspectives*. 111: 309-319.

ZHU, L.Y., and R.A. HITES, 2004 Temporal trends and spatial distributions of brominated flame retardants in archived fishes from the great lakes. *Environmental Science and Technology* 38: 2779-278.

9

RELEVANCIA DE LA REPRODUCCIÓN EN LA DIVERSIFICACIÓN DE LA PISCICULTURA MARINA EN ESPAÑA





RELEVANCIA DE LA REPRODUCCIÓN EN LA DIVERSIFICACIÓN DE LA PISCICULTURA MARINA EN ESPAÑA

José Pedro Cañavate

IFAPA Centro El Toruño. Junta de Andalucía

Resumen

Diversificar la piscicultura marina es objeto de trabajo en numerosas instalaciones acuícolas y especialmente desde el inicio de la década de los noventa, su evolución se está produciendo de forma paralela a la maduración y consolidación de las tecnologías de producción de los peces que representan la producción comercial en la actualidad, es decir dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y rodaballo (*Scophthalmus maximus*). A pesar del tiempo transcurrido desde el comienzo de estas iniciativas, ninguna especie nueva se ha incorporado al grupo de las tres anteriores, observándose una amplia dispersión de esfuerzos, consecuencia de la selección de un elevado número de nuevos potenciales candidatos. En este documento se realizan una serie de consideraciones a este respecto y se analiza el nivel de importancia que el control de la reproducción en cautividad tiene para conseguir la puesta en cultivo de nuevas especies de peces marinos de interés acuícola en España. Se revisan los avances conseguidos en la reproducción de un variado conjunto de peces, incluyendo diversos espáridos, el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), y algunas especies de mayor porte como seriola (*Seriola dumerili*), corvina (*Argyros-*



mus regius) o mero (*Epinephelus marginatus*). Actualmente se dispone de un importante volumen de información sobre técnicas para la reproducción de nuevos espáridos, que no se ha reflejado de momento en el correspondiente incremento de la producción industrial de estas especies. Los avances recientes también han sido notables en la reproducción del lenguado, aunque todavía se requiere un mayor progreso en el conocimiento de la fisiología de la reproducción y el comportamiento sexual de esta especie. No obstante, la reproducción en cautividad aparentemente ha dejado de ser el principal obstáculo para la producción en masa del lenguado. En las especies de mayor tamaño, se pone de manifiesto la necesidad de usar grandes infraestructuras de cultivo, acompañadas en algunas ocasiones por terapias hormonales específicas, para facilitar su correcto desarrollo gonadal en cautividad.

Abstract

*Marine fish farming diversification is an old aim of aqua culturist that has been more intensely accomplished since the 1990s. It has simultaneously evolved to the consolidation of the three main fish species that are responsible for present commercial marine fish production in Spain, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*), the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). Scientific and technical contributions after this time were, however, unable leading to new fish species being added to the above list. Efforts invested during this time were considered to be dispersed, as a consequence of the selection of an excessively elevated number of potential candidate species. Considerations at this regard are given in present work, and the level of relevance that controlled reproduction has on the achievement of new fish species commercial aquaculture is analysed. Advances in the reproduction of various sparid species, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*), and bigger sized fish such as the greater amberjack (*Seriola dumerili*), the meagre (*Argirosomus regius*) and the dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) are reviewed. Ample information on the reproduction of new sparid fish is detected; however there were no parallel correspondence in commercial production of these species. Significant progress has also been achieved in the reproduction of Senegalese sole, although much is still needed to*



know about the reproductive physiology and sexual behaviour of this flat fish. Nevertheless, sole reproduction in captivity does not seem to be at present the main concern to its aquaculture development, as it used to be for many years. In bigger size fish, the need for greater culture infrastructures, accompanied in some instances by specific hormonal therapies, has been evidenced.

Palabras clave: diversificación, peces, acuicultura, reproducción, esparidos, lenguado, corvina, seriola, mero.

9.1. ASPECTOS GENERALES Y CONSIDERACIONES PREVIAS

El desarrollo de técnicas para conseguir un control completo sobre el ciclo de vida en cautividad de cualquier organismo susceptible de explotación industrial es una actividad de carácter multidisciplinar, que se estructura en torno a cinco grandes áreas temáticas como son reproducción, alimentación, nutrición, patología y genética. Normalmente, la lógica indica que la reproducción en cautividad ha de ser la primera disciplina abordada a la hora de iniciar cualquier estudio de diversificación. Esto es algo también aplicable en el caso de la piscicultura marina, aunque existen excepciones en el registro histórico en relación a algunas actividades llevadas a cabo para la puesta en cultivo de algunas especies de interés acuícola, en las que no se ha seguido esta secuencia. De cualquier manera, siempre será mejor resolver en primer lugar la reproducción en cautividad para poder acceder a poblaciones de estados juveniles con las que comprobar la viabilidad de las ulteriores etapas del ciclo de producción.

Hay que reconocer inicialmente que a través de la evolución de la acuicultura marina durante las últimas tres décadas, no ha existido un criterio uniforme antes de abordar el estudio de los ciclos de producción en cautividad. Mas bien, los estudios se han adaptado en general a la mayor o menor complejidad de manejo que pudieran presentar las distintas fases del ciclo de vida de



las especies candidatas, llegando en algunos casos (atún, anguila) a niveles excesivos de sobreexplotación de las poblaciones salvajes para su uso acuícola. Acceder a dominar la reproducción en cautividad de nuevas especies piscícolas debe considerarse como una seria apuesta de futuro que puede, o no, desencadenar en la consecución de un ciclo integral de producción. Hay que ser también conscientes de que en el supuesto que la especie falle desde el punto de vista acuícola, la información adquirida sobre su reproducción podrá ser de gran valor para otros campos de actuación, entre los que se podría destacar el de la conservación de los recursos marinos.

La situación actual acerca de los conocimientos sobre la reproducción en cautividad de nuevas especies de peces marinos de potencial interés para la acuicultura en España es el eje central de este capítulo. La revisión pretende también realizar una diferenciación entre las nuevas especies en base a la contribución que puedan aportar a la industria y el mercado de la piscicultura marina. La justificación para la selección de nuevas especies argumentada hasta la fecha ha sido muy variada. Algunas especies estudiadas fueron seleccionadas de acuerdo a criterios de interés muy local, o bien debido a criterios simples como una buena facultad de crecimiento, observada en condiciones diferentes a las propias de una explotación acuícola. Sin embargo, si se es consciente del volumen de producción que la industria acuícola genera, rápidamente es posible pensar que la prioridad para la selección de nuevas especies debe venir marcada por un interés general más allá del ámbito local. No obstante, hay que reconocer que de los estudios con especies de ámbito local pueden surgir alternativas y/o complementos interesantes para especies ya consolidadas en el mercado acuícola. Lo realmente importante de estos estudios es llegar a conclusiones, positivas o negativas, en plazos cortos de tiempo. En caso de resultado positivo, el esfuerzo principal será trasladado a los especialistas en comercialización.

Una vez establecida la existencia de una amplia demanda de mercado como criterio prioritario para la selección de nuevas especies acuícolas, es conveniente considerar otros criterios de selección, que



han de contribuir igualmente en el proceso. Evidentemente, aspectos como supervivencia larvaria, adecuada tasa de crecimiento y tolerancia al hacinamiento han de regir la valoración final sobre las posibilidades reales de cada especie. Por otro lado, factores como la buena transformación del alimento y una conversión trófica eficaz han de ser también tenidos en cuenta. El primero hace referencia a la masa de alimento necesaria por unidad de biomasa producida, y es independiente de la posición trófica ocupada por la especie en cuestión, mientras que el segundo posiciona a cada especie de acuerdo al nicho trófico ocupado, siendo la conversión mas eficaz conforme la especie está mas cerca de los niveles tróficos bajos. Por último, criterios no estrictamente acuícolas, como podría ser la producción de juveniles de especies amenazadas para la recuperación de poblaciones salvajes, justifican plenamente abordar estudios de reproducción con nuevas especies de peces.

Esta revisión pretende también reflexionar y razonar sobre las especies de peces que son realmente interesantes para diversificar la piscicultura marina en España. Conviene evaluar los hitos conseguidos y su utilidad en la reproducción de nuevas especies, así como analizar los aspectos en los que no se ha avanzado a pesar de su necesidad. En el siguiente apartado se discute sobre los planteamientos y estrategias que han de ser abordados para la reproducción de nuevas especies de peces. Posteriormente, se ofrece una actualización científico-técnica acerca del estado sobre la reproducción en peces marinos de especies diferentes a las actualmente explotadas en la acuicultura industrial. En este punto hay que ser conscientes de la importante cantidad de información de que se dispone y que no trasciende al no ser publicada o difundida en un ámbito estrictamente científico. Se trata de una información de elevada componente zootécnica, generada en diferentes centros acuícolas. El trabajo continua con un análisis sobre la relevancia y el nivel de dependencia de la reproducción para el desarrollo acuícola de aquellas especies consideradas más importantes para la piscicultura marina española. Para concluir, se realiza una previsión sobre cuales habrían de ser las tendencias de trabajo futuro, en base a los resultados contenidos en esta revisión y la previsible evolución de la demanda acuícola.



9.2. PLANTEAMIENTOS ANTE EL ESTUDIO DE LA REPRODUCCIÓN DE NUEVOS PECES MARINOS

Hasta el presente, los planteamientos para abordar el cultivo de nuevas especies han sido muy variados y han derivado en un amplio número de peces que han sido objeto de estudios enfocados a su acuicultura. La alta diversidad piscícola y de hábitos de consumo de pescado, así como la heterogeneidad climática y geomorfológica del litoral español son factores que han contribuido sin duda a ello. Por el contrario, menos peso aparentan haber tenido factores relacionados con la demanda de mercado. Con la finalidad de reflejar de una manera suficientemente objetiva lo acontecido en el pasado reciente en relación a la diversificación piscícola, se han recogido y organizado los trabajos presentados durante los tres últimos Congresos Nacionales de Acuicultura, dentro de las correspondientes sesiones de reproducción y cultivo de nuevas especies. El resultado de este análisis se muestra en la Figura 1, para la cual se definen dos indicadores. Uno describe el porcentaje de trabajos sobre reproducción presentados para cada especie, mientras que el otro describe el porcentaje total de trabajos. De esta manera, puede visualizarse rápidamente la incidencia de los trabajos de reproducción en relación al conjunto global de trabajos presentados dentro del entorno de reproducción y cultivo de nuevas especies de peces marinos.

La figura 1 recoge una lista con un total de 17 especies de peces estudiadas y descritas durante el periodo contemplado. Esta cifra es sugerente de la dispersión del esfuerzo dedicado a la investigación para llegar a cultivar nuevas especies de peces. Hay que destacar además que en esta lista no se encuentran algunas especies de interés, actualmente en estudio, como el mero (*Epinephelus marginatus*) o la corvina (*Argyrosomus regius*). De las 17 especies en la figura 1, solo 4 repiten en los tres Congresos, siendo 3 de ellas (dorada, lubina y rodaballo) las especies que acaparan la práctica totalidad de la producción piscícola marina en España. No obstante, la proporción de trabajos relativos a la reproducción de dorada y lubina descendió a partir del IX Congreso, mientras que la representación del rodaballo fue siempre baja. La cuarta



especie que repite en los tres Congresos Nacionales es el dentón (*Dentex dentex*). Esta especie también presenta registros documentales sobre su reproducción y cultivo con anterioridad al VIII Congreso Nacional, pero a pesar de ello, su producción acuícola no existe. Por último, llama la atención la súbita entrada del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) a partir del IX Congreso, pasando a dominar de forma absoluta desde ese

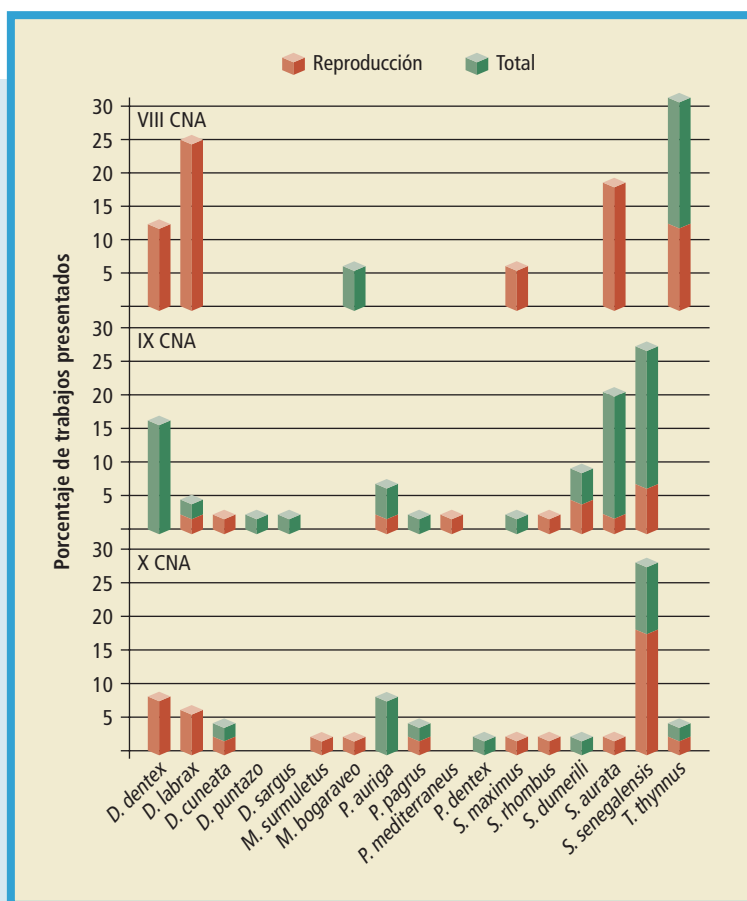


FIGURA 1.

Proporción de trabajos presentados en el octavo, noveno y décimo Congreso Nacional de Acuicultura relacionados con la reproducción de peces marinos (barra roja) y con el cultivo general de estas especies (barra verde).



momento el número de trabajos presentados, tanto sobre su reproducción como sobre sus técnicas generales de cultivo.

Cuando se abordan estudios para desarrollar la reproducción en cautividad de nuevas especies hay que prestar especial atención a la importante variabilidad existente en el patrón de reproducción entre ellas. Los requerimientos de manejo de estas especies van a venir determinados por su modelo de reproducción, además de otros factores inherentes a sus hábitos de vida. En algunas especies es muy importante evitar algunas pautas de manejo adquiridas de prácticas acuícolas previamente llevadas a cabo para la reproducción de otras ya conocidas, las cuales podrían causar un efecto negativo. Reconocer la variabilidad de reproducción entre especies e identificar las pautas de manejo que han de ser adaptadas a nuevos requerimientos específicos son tareas esenciales para el correcto desarrollo de la reproducción de nuevos peces. En el cuadro 1 se resumen algunos rasgos de la reproducción que pueden afectar al manejo y condiciones de estabulación de algunas de las especies incluidas en este estudio, que son objeto de revisión detallada en los apartados posteriores. El grupo de especies seleccionadas está compuesto por 11 potenciales candidatos, con mayor o menor experiencia de reproducción. Las características biológicas de la reproducción más importantes desde el punto de vista acuícola están relacionadas con la talla de primera maduración y puesta, la facilidad para completar el ciclo de maduración sexual en espacios confinados, además de algunos aspectos del comportamiento sexual. Resulta evidente que el acceso a la investigación para la reproducción de algunas nuevas especies pasa por el desarrollo previo de infraestructuras de cultivo de una magnitud muy superior a la utilizada para especies actualmente producidas a nivel comercial, y eso es algo que se escapa del alcance económico en bastantes casos.

La existencia de cualquier tipo de hermafroditismo frente a gonocorios, el tipo de sincronía del mecanismo de desove, así como los hábitos de los reproductores, son factores que también han de tenerse en cuenta para el manejo. No obstante, estos factores no llegan lógicamente a limitar tanto como los primeros, ya que se circunscriben más al ámbito de la habilidad de técnicos y operarios, y no suelen demandar grandes inversiones económicas.



CUADRO 1.

Tipo de sexualidad, tamaño de primera puesta y sistema de maduración ovárico en un grupo seleccionado de 11 especies de peces marinos con potencial para diversificar la piscicultura en España. La sexualidad de las especies puede ser gonocórica (G), hermafrodita (H), hermafrodita proterándica (H. ♂) o hermafrodita proteroginica (H. ♀). El sistema de maduración ovárico se establece de acuerdo a la descripción de Carrillo et al. (1993) en ovario sincrónico por grupos (SG) y ovario asincrónico (A).

Especie	Sexo	Talla primera puesta (cm)	Ovario	Referencias
<i>Argyrosomus regius</i>	G	72(♀) 82(♂)	SG	Cárdenas no pub.
<i>Dentex dentex</i>	G	21	A	Loir <i>et al.</i> , 2001
<i>Diplodus puntazzo</i>	H	21	A	Micale <i>et al.</i> , 1996
<i>Diplodus sargus</i>	H. ♂	17	A	Morato <i>et al.</i> , 2004
<i>Epinephelus marginatus</i>	H. ♀	50(♀) 100(♂)	SG	Zabala <i>et al.</i> , 1999b
<i>Pagellus bogaraveo</i>	H. ♂	26(♀) 32(♂)	A	Micale <i>et al.</i> , 2002
<i>Pagrus auriga</i>	H. ♀	22(♀) 55(♂)	A	Cárdenas <i>et al.</i> , 2003
<i>Pagrus pagrus</i>	H. ♀	25(♀) 29(♂)	A	Kokokiris <i>et al.</i> , 1999
<i>Seriola dumerili</i>	G	80(♀) 60(♂)	SG	Micale <i>et al.</i> , 1999
<i>Solea senegalensis</i>	G	32	A	Rodríguez 1984
<i>Thunnus thynnus</i>	G	98(♀) 105(♂)	A	Abascal <i>et al.</i> , 2003

La estructura y organización de estudios de reproducción en peces ha de pasar en primer lugar por la consecución de ejemplares con capacidad reproductora que se encuentren cautivos en unas condiciones en las que puedan desarrollar su instinto reproductor. Solo a partir de ese momento se puede plantear con garantía acometer los estudios fisiológicos que conduzcan a un conocimiento profundo de los mecanismos de reproducción, que faciliten el posterior desarrollo de técnicas específicas de reproducción.

Una vez adecuados los requisitos básicos de espacio, calidad de agua y nutritivos, además de la estabulación de un grupo de peces con talla y proporción sexual adecuadas, el primer paso a seguir consiste normalmente en la observación de su reproducción natural bajo las condiciones ambientales en las que se reproduce la especie. Si esta tarea se lleva a cabo de manera satisfactoria, gran parte de las especies ensayadas suelen responder positivamente y desovan en cautividad coincidiendo, en mayor o menor medida, con su periodo de puesta en la naturaleza. A este tipo de



puesta se le denomina puesta natural, y es la que mas abundantemente se registra con las nuevas especies. Un segundo nivel de complejidad en la reproducción de peces en cautividad estaría representado por la puesta natural manipulada, en la que el periodo de puesta de la especie puede dilatarse y/o desfasarse en el tiempo mediante la regulación de factores ambientales como el fotoperiodo y la temperatura. Estos aspectos se tratan detalladamente en otros capítulos de esta obra.

Cuando se recurre a la utilización de tratamientos con hormonas sexuales, bien para ayudar a finalizar la maduración sexual o para estimular finalmente la liberación de gametos, se suele hablar de puesta inducida. En las nuevas especies involucradas en la piscicultura marina, esta estrategia para conseguir la reproducción en cautividad se ha utilizado en algunos casos, normalmente siguiendo esquemas de tratamiento incorporados desde otras especies, y por lo tanto no optimizados después de estudios fisiológicos desarrollados específicamente.

Por último, la puesta artificial de las especies puede considerarse como el nivel más tecnificado de reproducción utilizado en la actualidad. Su éxito depende de la obtención manual de ovocitos y espermatozoides maduros, y la realización de una posterior fecundación «*in vitro*». Debido al elevado nivel de conocimiento requerido sobre maduración gonadal, además de la heterogeneidad en la facilidad para manipular ejemplares y conseguir gametos viables de los mismos, en las nuevas especies piscícolas la utilización de esta técnica reproductora esta poco extendida. Al igual que ocurriera con la puesta inducida, se ha tendido a actuar de acuerdo a técnicas puestas a punto para otras especies, que no siempre han dado resultados positivos.

Entre las especies ya mencionadas como candidatas para diversificar la piscicultura marina en España se ha logrado la reproducción en cautividad de un número significativo, aunque muchas de ellas no sean las que realmente interesan al sector acuícola o, al menos, ese interés no ha sido manifestado por el mismo en diferentes foros de debate. El que se haya logrado la reproducción de algunas especies nuevas de peces no significa que el control de esta etapa del ciclo biológico esté ya superado. Nada más lejos de la realidad, toda vez que la reproducibilidad, tanto geográfica como temporal, de la reproducción de algunas especies no es todavía suficientemente satisfactoria. Además,



los mecanismos reguladores de la reproducción en cautividad de estas especies están por determinar en muchos casos.

Un hecho observado en la reproducción de nuevas especies es el de no priorizar la realización de estudios fisiológicos detallados cuando la especie en cuestión muestra resultados aceptables en su reproducción natural (con o sin manipulación ambiental). La obtención de resultados de reproducción natural con facilidad podría pues ralentizar el progreso hacia lo que debería ser la meta final en todo proceso de puesta a punto de la reproducción de cualquier especie piscícola, como es la consecución de su reproducción artificial. Aunque la reproducción en cautividad de peces marinos ha dependido durante periodos dilatados de tiempo de la puesta natural o la inducida, casos típicos de la dorada y la lubina, siempre será necesario disponer de técnicas de reproducción artificial que permitan acometer las necesarias tareas de selección genética que deben ir asociadas al desarrollo integral del cultivo de cualquier especie acuícola.

El grado de conocimiento sobre la reproducción dentro del amplio grupo taxonómico de peces marinos considerados en la acuicultura española es variable según la especie que se trate. Ante tanta variedad taxonómica, y para efectuar un análisis detallado sobre los avances más recientes en la reproducción en cautividad de nuevas especies, se ha estimado conveniente agrupar las especies en base a criterios biológicos, que pueden coincidir o no con criterios taxonómicos, que se reflejan en unos requisitos de manejo diferencial. De esta manera, se realiza una evaluación del estado de la reproducción de nuevas especies considerando el grupo de los espáridos por un lado, un segundo grupo que incluye los peces planos, y un tercer grupo en el que se engloban aquellas especies cuyo porte es sensiblemente superior al de las especies habitualmente cultivadas.

9.3. EVALUACIÓN DE RESULTADOS SOBRE LA REPRODUCCIÓN DE ESPÁRIDOS

El éxito inicial de la reproducción en cautividad de la dorada, con el desarrollo de mecanismos sencillos de control de fotoperiodo y temperatura para regular las puestas en tanques comunitarios, animó el



estudio de otras especies de espáridos, cuyos requerimientos biológicos en cultivo se presumieron semejantes. De esta manera, se han desarrollado estudios para conocer la reproducción de varias especies de espáridos a lo largo del litoral español. Así, mientras en el Mediterráneo se ha trabajado principalmente con dentón (*Dentex dentex*), y sargos (*Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris*, *Diplodus puntazzo*), en el norte de España dominaron los estudios con besugo (*Pagellus bogaraveo*), siendo los pargos (*Pagrus pagrus*, *Pagrus auriga*) las especies más importantes en Canarias y el litoral sur atlántico ibérico. Otros espáridos estudiados de forma ocasional han sido la breca (*Pagellus erythrinus*) y la mojarra (*Diplodus bellotii*).

Los primeros trabajos sobre la reproducción de *D. dentex* describen su puesta natural en cautividad entre los meses de Mayo y Junio (Glamuzina *et al.*, 1989). Posteriormente, otros autores han descrito también la puesta natural de esta especie (Méndez *et al.*, 1995; Abellán 1997; Pastor *et al.*, 1997; Loir *et al.*, 2001). En la naturaleza, *D. dentex* desova entre Marzo y Julio (Morales-Nint y Moranta, 1997) y bajo condiciones naturales de estabulación en latitudes mediterráneas, Pavlidis *et al.* (2000) indican un intervalo de puesta de ocho a diez semanas entre abril y junio, coincidiendo con fotoperiodo en incremento, de 12:30 a 14:40 horas de luz al día. Durante este periodo, las puestas se produjeron en un intervalo de temperatura variable, de 16 °C a 22 °C. La fecundidad anual descrita para esta especie es variable, pero en la mayor parte de los casos oscila entre 600.000 huevos (Loir *et al.*, 2001), y 1.500.000 huevos producidos por hembra estabulada (Abellán *et al.*, 1997).

A partir de las primeras observaciones de reproductores de *D. dentex* en cautividad, se sugirió que se trataba de un pez con hermafroditismo proterándico (Glamuzina *et al.*, 1989). Sin embargo, estudios posteriores (Abellán 2000; Grau *et al.*, 2001; Loir *et al.*, 2001) revelaron que se trata de un espárido gonocórico, en el que los sexos se diferencian a partir de tallas superiores a 18 cm. La primera talla de maduración sexual se sitúa en 21 cm (Loir *et al.*, 2001), y los primeros desoves en cautividad se producen con animales a partir de un peso de 900 g (Abellán 2000). Las hembras presentan un típico ovario de maduración asíncrona (Loir *et al.*, 2001), tratándose de individuos que desovan par-



cial y continuadamente a lo largo de su periodo de puesta, en el cual pueden producir entre 4 y 18 lotes sucesivos de huevos (Pavlidis *et al.*, 2000). La totalidad de los ejemplares macho suele comenzar a producir esperma con dos meses de antelación a la maduración final de las hembras (Pavlidis *et al.*, 2000), adquiriendo además una tonalidad azul mas brillante durante el periodo de puesta (Pastor *et al.*, 1977).

Se ha comprobado que el periodo natural de puesta de *D. dentex* puede ser notablemente ampliado mediante manipulación del fotoperiodo. De esta manera, Pavlidis *et al.*, (2001), combinando ciclos de inducción y demora de maduración sexual en diferentes lotes mantenidos a temperatura constante entre 19 °C y 20 °C, consiguieron puestas de *D. dentex* durante un periodo continuado de nueve meses, en el que los parámetros indicadores de viabilidad de las mismas fueron similares a los obtenidos a partir de los individuos control. En relación al uso de tratamientos hormonales, Glamuzina *et al.*, (1989) refirieron los primeros resultados positivos de puesta inducida al tratar los reproductores con gonadotropina coriónica humana (GCH). No obstante, las larvas producidas de esta manera presentaron serios problemas para alimentarse al inicio de su desarrollo, algo que podría haber sido consecuencia de estados débiles o de subdesarrollo, y con un hipotético origen en una aplicación hormonal inadecuada. Mas tarde, el uso de implantes de GnRH se comprobó como un método eficaz para inducir la maduración final del ovocito y la ovulación, aumentando en un orden de magnitud la producción de huevos en reproductores de *D. dentex* (Pavlidis *et al.*, 2000). Estos implantes no produjeron efectos fisiológicos importantes sobre la población de machos.

El pargo común (*P. pagrus*) es otro de los espáridos que más atención ha recibido desde el punto de vista acuícola, siendo su reproducción estudiada desde hace tiempo. Se trata de una especie con una distribución geográfica más amplia que la anterior, distribuyéndose además por una vasta zona del océano atlántico, contribuyendo este hecho a que su interés comercial sea superior. El periodo de reproducción de *P. pagrus* en la naturaleza está comprendido entre febrero y junio (Vassilopoulou y Papaconstantinou, 1992; Pajuelo y Lorenzo, 1996; Mihelakakis *et al.*, 2001), coincidiendo prácticamente con el descrito para su puesta natural en cautividad, entre los meses de enero y mayo,



y con temperaturas del agua entre 15,8 °C y 19,2 °C (Mylonas *et al.*, 2004). Se conoce que la reproducción en el medio natural se realiza en aguas de 50 a 150 m de profundidad en las que la temperatura se sitúa entre 14,5 °C y 16,5 °C (Machias *et al.*, 1998). En aguas de las Islas Canarias la temperatura a la que *P. pagrus* se reproduce varía entre 18 °C y 20 °C (Pajuelo y Lorenzo, 1996). Los ejemplares en cultivo alcanzan la talla reproductora más rápidamente que los salvajes, gracias a la disponibilidad de alimento ilimitada y la superior temperatura de crecimiento (Machias *et al.*, 1998). Sin embargo, ello no va acompañado de maduración precoz, habiéndose observado que *P. pagrus* madura por primera vez a la edad de tres años, momento en el que histológicamente hay un 11 % de hembras y un 77 % de machos (Kokokiris *et al.*, 1999). Al cuarto año de edad más de la mitad de las hembras están maduras sexualmente.

La fecundidad anual obtenida para grupos mantenidos en cautividad puede variar entre 200.000 huevos por kg⁻¹ (Kolios *et al.*, 1997), algo más de 400.000 huevos kg⁻¹ (Mylonas *et al.*, 2004), o 770.000 huevos kg⁻¹ (Mihelakakis *et al.*, 2001). Estos datos no pueden ser adecuadamente comparados con los aportados previamente para *D. dentex*, debido a la diferente forma en que los autores han expresado la fecundidad anual. En este sentido, es más recomendable expresar fecundidad en relación a la biomasa de hembras estabuladas, ya que ello permite obtener una más clara visión de este parámetro entre especies. La estabulación inicial de una población de pargos entre 517 g y 1108 g de peso, apenas produjo puestas de importancia durante los dos primeros años en cautividad (Cárdenas y Calvo 2003). Sin embargo, al tercer año, después de una correcta aclimatación y alcanzar pesos entre 858 g y 2127 g (media de 1424 g), se obtuvo de forma espontánea un total de 31,3 10⁶ huevos a partir de un conjunto de 40 reproductores durante el periodo global de puesta (Cárdenas y Calvo 2003). Estos autores no refieren la proporción de sexos estabulada, pero a partir de los datos facilitados se puede intuir una fecundidad para el ciclo anual sensiblemente superior a la mencionada con anterioridad. Las tasas de fertilización registradas en tanques de puesta natural varían desde 36,9-68,9 % (Mylonas *et al.*, 2004), hasta 75,9 % (Cárdenas y Calvo 2003), 85-95 % (Kolios *et al.*, 1997), y 95-100 % (Mihelakakis *et al.*, 2001).



La hurta (*Pagrus auriga*) es una especie muy similar al pargo, con la que llega a generar híbridos de forma natural en tanques de puesta con poblaciones conjuntas (Manchado *et al.*, 2005). Ello, a pesar de presentar una estacionalidad notablemente desfasada para su periodo de reproducción en la naturaleza, donde se describen los meses de Septiembre a Febrero, con un máximo en Octubre-Noviembre, como los de su actividad reproductora en el mar (Pajuelo *et al.*, 2006). Estas fechas coinciden con las observaciones realizadas en ejemplares que desovaron naturalmente en cautividad (Cárdenas *et al.*, 2003). Al igual que el pargo, presenta hermafroditismo proterogínico, apareciendo machos en la población a partir de tallas superiores a 55-65 cm (Cárdenas *et al.*, 2003). La fecundidad anual obtenida para un grupo de 130 reproductores de *P. auriga* (de los cuales solo 9 de ellos se estimó fueron machos funcionales) mantenidos en un tanque de puesta natural de 250 m³ de capacidad, fue de $4,6 \cdot 10^6$ huevos (Cárdenas *et al.*, 2003). Este valor es sensiblemente inferior a los descritos para *P. pagrus*, y probablemente refleje una mayor complejidad estructural de sexos. El porcentaje de fertilización de los huevos producidos naturalmente por *P. auriga* fue del $64,7 \pm 18,0$, mas cercano al de *P. pagrus*. Ambas especies se diferencian también en los valores óptimos de temperatura en los que el desove es de mayor cuantía, siendo los intervalos 16 °C-18 °C para *P. pagrus*, y 19 °C-22 °C para *P. auriga*, en los que se da máxima fecundidad (Cárdenas *et al.*, 2005).

Tres especies de sargo (*Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris* y *Diplodus puntazzo*) han sido objeto de interés acuícola desde hace tiempo, remontándose los trabajos para lograr su reproducción en cautividad a la década de los ochenta. Sin embargo, los sargos no han llegado a representar una importante alternativa en la acuicultura, por motivos que trascienden de los objetivos de este trabajo. La reproducción de varios tipos de sargo se viene realizando en tanques de puesta natural en algunas instalaciones del entorno mediterráneo como complemento a la de las especies principales.

El sargo picudo (*D. puntazzo*) es un espárido hermafrodita con puestas secuenciales, que madura entre los meses de Agosto y Octubre en aguas del mediterráneo occidental (Hernández *et al.*, 2003), y entre Octubre y Noviembre en el mediterráneo oriental (Marangos



1995). No hay evidencias de inversión sexual, y el hermafroditismo mostrado por esta especie se puede considerar como ambisexual, dado que las poblaciones reproductoras analizadas muestran gónadas que incluyen de forma simultánea tejidos ováricos y testiculares, si bien siempre existe predominancia de un tejido sobre el otro en la mitad de la población (Micale *et al.*, 1996). Se trata de una especie para la que se han descrito pobres resultados sobre su reproducción en cautividad. Los primeros intentos para reproducir *D. puntazzo* indicaron su dificultad para desovar naturalmente en tanques de cultivo, siendo el tratamiento con gonadotropina coriónica humana (GCH) la única vía de obtener algún resultado positivo de desove, aunque no satisfactorio (Faranda *et al.*, 1985). Estos pobres resultados fueron confirmados posteriormente por Georgiou y Stephanou (1995), quienes fracasaron en la obtención de puestas tanto naturales como inducidas con GCH o con hormonas liberadoras de gonadotropinas. Estos autores describen además esta situación como generalizada en varias instalaciones de la costa oriental mediterránea. Asimismo, describen el desarrollo de la maduración gonadal en este área geográfica entre Octubre y Diciembre, periodo de tiempo ligeramente desfasado respecto del descrito para la zona occidental. Uno de los principales factores que aparentemente condicionan la reproducción en cautividad de *D. puntazzo* es el estrecho margen de temperatura (19 °C-21 °C) en el que realizan el desove (Georgiou y Stephanou 1995). Además, oscilaciones bruscas en la temperatura del agua, incluso dentro del margen óptimo, se han asociado con serias perturbaciones en la puesta de reproductores mantenidos en cautividad (Marangos 1995).

La maduración gonadal de *D. vulgaris* se produce durante el mismo periodo que la de *P. puntazzo*. Sin embargo, se ha descrito que la puesta natural de esta especie se produce con mayor facilidad (Dujakovic y Glamuzina 1988). El sargo común (*D. sargus*) muestra una amplia plasticidad en su reproducción, presentando un periodo de maduración principal entre Marzo y Junio en latitudes de las Azores, el cual se amplía, tanto en el hemisferio norte como en el sur, conforme incrementa la latitud, consecuencia probablemente del incremento paralelo de la temperatura (Morato *et al.*, 2003)



El besugo (*Pagellus bogaraveo*) es una especie de muy alto valor comercial en España, cuya biología pesquera y acuicultura se han estudiado con cierto detalle, aunque todavía no existe una producción industrial acuícola relevante, a pesar de los avances tecnológicos registrados. Se conoce que es una especie que se reproduce naturalmente en el norte de la Península Ibérica entre los meses de Marzo y Mayo (Fernández-Pato *et al.*, 1990), coincidiendo este periodo prácticamente con el descrito para el desove natural de ejemplares reproductores mantenidos en cautividad (Olmedo *et al.*, 1998). Puestas espontáneas han sido también descritas para reproductores en cautividad de esta especie por Peleteiro *et al.*, (2000), así como por Micale *et al.*, (2002), estos últimos después de proceder a una manipulación sencilla de los peces. El besugo es un espárido que presenta hermafroditismo protándrico, con la peculiaridad de la existencia de una elevada proporción de hembras gonocóricas, que alcanza hasta el 41 % de poblaciones en cautividad (Micale *et al.*, 2002).

Al igual que sucede en *Pagrus* con el uso de tanques voluminosos (Cárdenas y Calvo 2003), se recomienda utilizar infraestructuras de cultivo de mayor tamaño para mantener los reproductores de *P. bogaraveo*, citándose el uso de tanques de 32 m³ y de 120 m³ como adecuados para el desove natural (Peleteiro *et al.*, 2000). En relación a la inducción hormonal a la puesta, la escasa información disponible hace referencia a que un tratamiento con dosis progresivas de LHRHa no produjo efecto significativo sobre el estado de madurez del ovario (Peleteiro *et al.*, 2000).

9.4. AVANCES EN LA REPRODUCCIÓN DE PECES PLANOS

Bajo la denominación de peces planos se engloba un variado grupo taxonómico de peces con hábito de vida bentónico y de gran valor comercial. El máximo exponente para la acuicultura en España lo representa el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), especie bien consolidada en el sector productor, sobre la que probablemente se dispone del mayor grado de control para su reproducción en cautividad entre el conjunto de peces marinos de interés acuícola en España. El interés general derivado



de la demanda del mercado hacia peces planos se tradujo hace tiempo en trabajos de investigación que permitieran acceder a técnicas para la producción de otros peces planos muy demandados como son los lenguados del género *Solea*. Desde el punto de vista acuícola, son dos las especies de lenguado más estudiadas. Por un lado está el lenguado común (*Solea solea*), especie que no debe considerarse como novedosa, toda vez que los primeros estudios sobre su reproducción en cautividad se remontan 30 años atrás (Devauchelle *et al.*, 1987). Más reciente, y restringido al ámbito de la Península Ibérica, son los estudios llevados a cabo con el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), especie muy similar externamente a la anterior, pero con una distribución hacia latitudes más bajas, si bien solapa con *S. solea* en una amplia región. Tampoco debe considerarse como una especie de estudio reciente, ya que los primeros trabajos sobre su reproducción también tienen cierta antigüedad (Rodríguez 1984; Dinis 1986). A diferencia de los espáridos, ambas especies de lenguado presentan un claro patrón sexual gonocórico, aunque la diferenciación externa entre sexos no es manifiesta, salvo cuando el ovario alcanza un avanzado estado de maduración en las hembras.

La reproducción de *S. solea* se produce de forma natural con relativa facilidad a partir de ejemplares mantenidos en cautividad. Devauchelle *et al.* (1987) realizaron una amplia descripción sobre los sistemas empleados para la obtención en masa de huevos embrionados de *S. solea* desde el año 1975. Estos autores fijaron el periodo natural de reproducción en cautividad entre los meses de Marzo y Mayo, a la vez que establecieron una ligera variabilidad en torno a esos valores en función de la temperatura del agua. Así, el intervalo óptimo para el desove de *S. solea* lo establecieron para temperaturas del agua entre 8 °C y 12,5 °C, con máximos de fecundidad en 10,5 °C, siendo posible ampliar dicho intervalo si la temperatura del agua era mantenida artificialmente dentro de los límites establecidos. Por otro lado, atribuyeron una especial importancia a la temperatura del agua durante el periodo invernal en el que se produce la maduración sexual, citando una producción de huevos notablemente reducida cuando la temperatura invernal no descendió por debajo de 10 °C.

El lenguado común presenta un típico ovario de maduración asín-crona, correspondiendo a un patrón secuencial de desove durante el



periodo de puesta. La fecundidad media anual, medida como producción de huevos en los diferentes lotes de reproductores estabulados, es muy variable, con valores medios de 140.000 huevos kg^{-1} (Devauchelle *et al.*, 1987). Los ensayos de control hormonal de la reproducción indicaron la posibilidad de favorecer una ovulación precoz, seguida de puesta espontánea, tras la inyección de un análogo de la hormona LH-RH (Ramos 1986a). Sin embargo, el porcentaje de fertilización de los huevos fue inferior al registrado en individuos no tratados hormonalmente. El tratamiento con dosis únicas de GCH (250 a 500 UI kg^{-1}) en hembras de *S. solea* en su estado final de vitelogénesis, mostró también resultados positivos de inducción a la puesta, y en este caso se registraron porcentajes de fertilización de los huevos entre 15 % y 80 % (Ramos 1986b). Por otro lado, Bertotto *et al.*, (2005) describieron una notable reducción en el periodo de puesta cuando a los peces se les administró un antagonista de GNRH de liberación lenta.

El hecho de que el interés por la acuicultura del lenguado senegalés (*S. senegalensis*) estuviese restringido al Suroeste peninsular durante mucho tiempo (Cañavate 2005), hizo que los estudios sobre su reproducción se hayan llevado a cabo básicamente en el litoral Sur Atlántico. Dinis *et al.* (1999) describen la reproducción natural de *S. senegalensis* en Portugal durante los meses de Marzo a Junio. Desde el año 1992 esta especie desova naturalmente en las instalaciones del CIFAP «El Toruño» (IFAPA, Junta de Andalucía), donde se ha descrito recientemente la relación encontrada entre el régimen de fluctuación del termo ciclo y la puesta natural de ejemplares adultos estabulados en cautividad (Anguis y Cañavate 2005). Durante muchos años, la ausencia de unas adecuadas condiciones de reproducibilidad en relación al patrón de manejo conocido, ha sido probablemente la causa por la que otras instalaciones no hayan podido acceder a conseguir la reproducción natural de *S. senegalensis*. Afortunadamente, la situación general ha evolucionado recientemente, y varias instalaciones, públicas y privadas, son actualmente capaces de conseguir desoves en cautividad de *S. senegalensis*. Además de las fluctuaciones en la temperatura del agua, otros factores como el origen y aclimatación de los reproductores, la dieta y la calidad físico-química del agua, han sido más seriamente considerados, dando como resultado que un total de nueve instalacio-



nes distribuidas por el litoral Ibérico han conseguido reproducir naturalmente esta especie.

La reproducción natural de *S. senegalensis* en cautividad se produce durante varios meses del año, y comprende un periodo principal de puesta entre Febrero y Junio, y uno secundario en otoño (Anguis y Cañavate 2005). El desove se produce mayoritariamente después de incrementos en la temperatura del agua de hasta 2,5 °C en las 48 horas previas, y dentro de un amplio margen de temperatura, entre 15 °C y 22 °C (Anguis y Cañavate 2005). La fecundidad máxima se registra entre 18 °C y 19 °C. La fecundidad es elevada, alcanzando 1,65 10^6 huevos kg^{-1} , en un ciclo anual. Estos valores son muy superiores a los anteriormente mencionados para *S. solea*, contribuyendo a esta diferencia el hecho de que *S. senegalensis* presente un mas dilatado periodo de puesta, además de una alta frecuencia de puesta dentro de este periodo. Al igual que en *S. solea*, la fecundidad muestra una elevada variabilidad entre registros diarios. En este sentido, y de forma común para ambas especies, hay que puntualizar sobre la dificultad que, con los medios zootécnicos actuales, existe para conocer el número de progenitores que en cada momento están contribuyendo a la progenie. Este factor esta probablemente en el origen de semejante elevada variabilidad en la fecundidad, y puede ser consecuencia de una fuerte estructuración jerárquica dentro del grupo de reproductores estabulados en un tanque comunitario. En este sentido, Baynes *et al.* (1994) describieron la existencia de un fuerte componente social dentro de una población de *S. solea* mantenida en tanques de puesta.

La naturaleza asíncrona del ovario de *S. senegalensis* (Rodríguez 1984) coincide con la existencia de un amplio periodo de puesta. Además el hecho de observar machos que producen esperma durante todo el año (Anguis y Cañavate 2005) es congruente con tan dilatado plazo para la emisión de ovocitos viables. Bajo determinadas condiciones de atenuación artificial del ciclo natural de elevadas temperaturas estivales, se ha podido comprobar durante dos años sucesivos, como una población cautiva de *S. senegalensis* mantenida en un sistema de recirculación, ha sido capaz de producir puestas naturales con viabilidad normal durante diez meses al año ininterrumpidamente, de Febrero a Noviembre (Cañavate *et al.*, 2005). Estudios llevados a cabo



por Vázquez *et al.*, (2003) pusieron de manifiesto la importancia de un descenso en la temperatura del agua durante el invierno, de cara a la posterior consecución de puestas. Así, la reducción térmica de 20 °C a 16 °C durante un mes correspondiente a un ciclo anual de puesta, y una reducción similar a 15 °C en el siguiente ciclo anual, condujo a la obtención de 20 y 38 puestas, respectivamente. Sin embargo, los porcentajes de viabilidad fueron muy bajos respecto de los descritos previamente, y tan solo 10 del total de las puestas presentaron algún índice de fertilización. La mayor importancia de estos resultados radica en haber asociado una variación en el régimen de temperatura del agua, con la subsiguiente consecución de puestas por primera vez en una instalación en la que el uso repetido de agua de pozo con temperatura estable todo el año nunca había producido resultado alguno de puesta.

Si la temperatura es un factor asociado a la maduración y puesta del *S. senegalensis*, todavía no se puede establecer una relación clara entre el fotoperiodo y la reproducción de esta especie. García-López *et al.* (2003) observaron una inhibición en la producción de 17 beta estradiol en primavera, en hembras sujetas a fotoperiodo permanente. Estas mismas condiciones extremas, de luz permanente, redujeron notablemente la maduración gonadal, tanto en hembras como en machos (García-López *et al.*, 2006). No se dispone todavía de estudios relacionados con la influencia de diferentes ciclos de luz y oscuridad sobre la maduración gonadal de este lenguado, pero aparentemente cuesta pensar en una elevada importancia del fotoperiodo como elemento para inducir la reproducción de *S. senegalensis*, sobre todo si se considera que ambos sexos se encuentran maduros sexualmente la práctica totalidad del ciclo anual, y que solo la temperatura en condiciones extremas es capaz de reducir el estado de madurez en las hembras. De confirmarse, esta sería una interesante diferencia en relación a la cercana especie *S. solea*, con mayor distribución en latitudes mas altas, para la que se ha descrito la posibilidad de regular la reproducción en cautividad a través del fotoperiodo (Baynes *et al.*, 1993).

La puesta inducida hormonalmente en *S. senegalensis* se ha efectuado en algunas ocasiones siguiendo esquemas derivados de los utilizados en otros peces. Así, los primeros ensayos de inducción con LH-



RH produjeron resultados positivos de puesta, pero en todos los casos los huevos no fueron viables, y aparentemente no estaban fecundados (Agulleiro *et al.*, 2006). De forma parecida, Guzmán *et al.* (2005) comprobaron la mayor eficacia de la GNRHa cuando fue aplicada en implantes de liberación sostenida frente a la inyección directa de esta hormona. Sin embargo, todos los huevos producidos mediante este sistema de estimulación tampoco progresaron al estado embrionario. Parece como si este tipo de estimulación hormonal fuera funcional solo en hembras, aunque también habría que tener en cuenta a este respecto la posible elevada componente de jerarquía social existente entre la población reproductora.

Una característica importante de *S. senegalensis*, que dificulta el acceso al control de su reproducción artificial, es el reducido tamaño de un testículo típicamente oligospermico, en el que la espermatogénesis es semicística (García-López *et al.*, 2005). Las cantidades de semen que se pueden extraer por masaje raramente superan los 100 μ L de volumen (Cabrita *et al.*, 2006). Por otro lado, la elevada complicación para extraer manualmente ovocitos maduros del ovario de las hembras mediante masaje abdominal, añade un punto más de dificultad para lograr su reproducción artificial. Esta faceta de la reproducción de *S. senegalensis* se muestra mucho más compleja en relación a una especie desarrollada como es el rodaballo.

La acuicultura del rodaballo se centra en el Norte de España debido básicamente a la idoneidad del régimen de temperaturas del agua. Una especie filogenéticamente cercana como es el rombo (*Scophthalmus rhombus*) habita en aguas mas templadas, por lo que podría ser una buena candidata para su producción en el Sur. Recientes estudios llevados a cabo en el CIFAP «Agua del Pino» (IFAPA, Junta de Andalucía) han puesto de manifiesto la viabilidad de aplicar en *S. rhombus* las diferentes técnicas de reproducción desarrolladas para *S. maximus* (Hachero *et al.*, 2005). La gran similitud biológica entre ambas especies ha permitido el trasvase de métodos de una a otra, colocando en un breve plazo a *S. rhombus* como una especie bien posicionada desde el punto de vista de su reproducción en cautividad. Una especie de ámbito local como es la acedía (*Dicologlossa cuneata*) se ha incorporado recientemente al grupo de nuevas especies de peces planos actualmente en



estudio en España. Se trata de un género de menor tamaño, en el que los lotes de reproductores se conforman con individuos a partir de 30 g de peso, y cuya reproducción natural en cautividad ha sido descrita para ejemplares estabulados en tanques comunitarios (Herrera *et al.*, 2005). Estos autores describen la buena capacidad de adaptación a las condiciones de cautividad de ejemplares salvajes usados para la reproducción, y registran un periodo de puesta en cautividad entre Enero y Junio. Durante este plazo de tiempo se produce una alta fecundidad, cifrándose entre $1,1 \cdot 10^6$ y $1,8 \cdot 10^6$ la cantidad de huevos producidos por kg de hembra y año, valores muy parecidos a los descritos anteriormente para *S. senegalensis*.

9.5. ESTUDIOS SOBRE LA REPRODUCCIÓN DE PECES CON TALLA SUPERIOR

El trabajo acuícola con especies de la ictiofauna marina cuyo porte es sensiblemente superior al de las especies consideradas hasta el momento representa un importante cambio cuantitativo y cualitativo en lo que a las pautas de manejo se refiere. Además del salto en la dimensión de las estructuras para la estabulación de ejemplares reproductores, algunas especies suelen presentar una fisiología o un comportamiento reproductor que añaden más importancia al requerimiento de espacio. Dentro de este grupo heterogéneo hay que resaltar cuatro especies, en base a su importancia económica, zootécnica o ecológica. Estas son, el atún rojo (*Thunnus thynnus*), la corvina (*Argyrosomus regius*), la seriola (*Seriola dumerili*) y el mero (*Epinephelus marginatus*).

Debido a la gran demanda comercial existente para el atún rojo, el interés por su biología y cultivo es antiguo, no solo en España, sino en varios países. De hecho, la reproducción controlada de esta especie se viene estudiando desde hace más de tres décadas. El ciclo reproductor en su migración para desove en el mediterráneo ha sido estudiado tanto en hembras (Corriero *et al.*, 2003) como en machos (Medina 2003). La reproducción en el medio natural se lleva a cabo en aguas cercanas al Archipiélago Balear y las costas de Cerdeña durante los meses de Julio y Agosto. La edad de primera maduración se produce al tercer año de vida, presentando esta especie un ovario de maduración asíncona



con ciclos de ovulación diarios (Abascal *et al.*, 2003). En Europa, los diversos intentos para aclimatar reproductores de *T. thynnus thynnus* a condiciones de cautividad pasaron por la previa construcción de grandes infraestructuras de cultivo en tierra (Fores *et al.*, 2000; Cárdenas *et al.*, 2002). Sin embargo, hasta la fecha no se ha obtenido éxito reproductor alguno con este sistema debido básicamente a la dificultad por transportar y aclimatar ejemplares potencialmente reproductores (García-Gómez *et al.*, 2003). La dificultad para el manejo de esta especie es grande, y la única vía por la que se han conseguido huevos embrionados hasta el momento ha sido a partir de ejemplares estabulados en grandes jaulas flotantes (Ioka *et al.*, 2000). Esta práctica de la reproducción del atún rojo (*T. thynnus orientalis*) se ha llevado a cabo en Japón desde hace tiempo, donde en 1979 se obtuvieron las primeras puestas para ejemplares estabulados en cautividad (Miyashita *et al.*, 2000). Los resultados registrados desde entonces parecen prometedores en lo que a producción de huevos se refiere, pero hay que tener en cuenta la existencia de una escasa capacidad de predicción sobre este fenómeno, toda vez que lotes maduros que habían desovado en años previos, no lo hicieron de forma regular en años sucesivos (Ioka *et al.*, 2000; Sawada *et al.*, 2005). Se trata de un sistema muy dependiente de cambios en las condiciones ambientales y de posibles variaciones en el estado fisiológico de los peces entre ciclos de puesta.

A pesar de la complejidad y dimensión de las infraestructuras flotantes utilizadas en la reproducción del atún, son varios los millones de huevos, con muy alta tasa de flotabilidad (91,8 %-100 %), recogidos en diferentes campañas (Sawada *et al.*, 2005). Estos autores describieron un periodo de 41 días, entre Julio y Agosto, en el que los ejemplares de atún estabulados en grandes jaulas flotantes desovaron naturalmente, con temperaturas del agua entre 23,2 °C y 29,2 °C. Durante el cortejo previo a la puesta, los machos adquieren una tonalidad más oscura, y uno o dos ejemplares suelen aproximarse a una hembra. Este proceso se produce normalmente entre cuatro horas con antelación a la puesta de sol, y la propia puesta de sol (Ioka *et al.*, 2000). Las primeras puestas recogidas en cautividad fueron cultivadas hasta obtener ejemplares adultos que dieron lugar posteriormente a los primeros reproductores nacidos en cautividad. Estos peces fueron capa-



ces también de reproducirse naturalmente en las jaulas, cerrando así el ciclo biológico de esta especie en cautividad (Sawada *et al.*, 2005). En relación a tratamientos hormonales, Mylonas *et al.* (2006) ensayaron la aplicación de un antagonista de liberadoras de gonadotropinas (GnRHa) mediante implantes de liberación sostenida, en ejemplares maduros de *T. thynnus* estabulados en jaulas flotantes en Baleares, observando ovulación en hembras y espermiación en machos, así como la producción, a los tres días, de huevos fertilizados que dieron lugar a larvas. Sin embargo, este trabajo no describe sobre efectos específicos del tratamiento hormonal en los peces tratados en relación a los utilizados como control. En un estudio similar realizado por Correiro *et al.* (2006), se indica la efectividad del tratamiento con GnRHa sobre la estimulación en la maduración final del ovocito, y la ovulación espontánea en cautividad en hembras específicamente tratadas, llegando incluso a fertilizar artificialmente óvulos maduros obtenidos a partir de las hembras sacrificadas. Por el contrario, el tratamiento con GnRHa no produjo una modificación significativa sobre la movilidad ni sobre la concentración del esperma en machos sometidos a tratamiento hormonal (Fauvel *et al.*, 2006).

La corvina (*A. regius*) es otra especie de elevado porte cuyo interés acuícola es también alto. La información relacionada con su reproducción en cautividad apenas esta difundida. Sin embargo, se tiene constancia de la producción de varios millones de alevines en criaderos de Francia e Italia desde hace unos años (Divanach 2002). Se trata de una especie gonocórica, cuya reproducción se encuentra asociada a ambientes de estuario (Quero y Vayne, 1993), por lo que la salinidad podría desempeñar un papel significativo en este proceso. Muy recientemente, se ha descrito la reproducción en cautividad de dos lotes de reproductores procedentes de la desembocadura del Guadalquivir (Cárdenas, comunicación personal). Estos peces, con peso superior a los 8 kg, respondieron positivamente a un tratamiento sencillo con GnRHa, dando lugar a puestas viables en las Instalaciones de LIMIA (Baleares) y del IFAPA Centro El Toruño (Cádiz), que presentaron alta tasa de eclosión. El periodo de obtención de las puestas estuvo comprendido entre Junio y Julio, meses en los que naturalmente madura la corvina. Es preciso realizar mas trabajos sobre la reproducción de *A. regius* de



cara a conocer la fecundidad total por ciclo de puesta, así como sobre la posibilidad de conseguir mas de un desove por hembra.

La seriola (*Seriola dumerili*) es una especie de distribución global cuya reproducción ha sido estudiada en diversos países, debido al interés general de su producción. Se trata de un pez pelágico que presenta sexos bien separados, ocurriendo la maduración sexual cuando alcanzan una talla de 60 cm los machos, y 80 cm las hembras. Micale *et al.*, (1999) describen ovarios desarrollados en mayo para hembras de 80 cm que tenían cinco años de edad, mientras que Marino *et al.*, (1995) encontraron niveles similares de desarrollo ovárico en hembras salvajes de 81,5 cm de longitud pero con edades de tres y cuatro años. Estos resultados apuntan a que la talla del pez es un factor más importante que la edad en la maduración gonadal de esta especie. Mandich *et al.* (2004) también describen las primeras ovulaciones de *S. dumerili* en el mes de Mayo, presentando además información relativa a la existencia de un pico de vitelogenina, simultáneamente al de otros esteroides sexuales, en el mes de Junio, pasando a no detectarse en Agosto, cuando el desove había terminado. Los machos presentan un máximo de testosterona en plasma coincidiendo con la espermatogénesis, mientras que la 11-keto-testosterona es la hormona que mas incrementó su nivel entre los meses de Mayo y Junio, cuando los machos producían semen activamente (Mandich *et al.*, 2004). Las hembras presentan un ovario en el que maduran múltiples grupos de ovocitos de naturaleza sincrónica (Marino *et al.*, 1995; Micale *et al.*, 1999; Mylonas *et al.*, 2004). En base a un análisis histológico, Marino *et al.* (1995) postularon que el intervalo de tiempo entre puestas en la seriola es superior al de otras especies acuícolas. Dada la amplia distribución geográfica de esta especie, tanto el periodo natural de puesta como su duración, varía según la localidad, estando asociado este periodo fundamentalmente al incremento en la temperatura del agua producido en primavera (Grau 1992).

Los ejemplares salvajes utilizados para la reproducción suelen aclimatarse bien a las condiciones de cautividad, e inician el desarrollo gonadal. Sin embargo, la vitelogénesis final y la maduración final del ovocito se inhiben en cautividad, apareciendo atresia folicular generalizada en la época natural de puesta (Micale *et al.*, 1999). Estos



autores sugieren una insuficiente estimulación de gonadotropina en cautividad, debido al stress producido por el confinamiento, pero no aportan información sobre las cargas utilizadas ni sobre el tamaño de los tanques. Este fracaso para completar la maduración del ovocito en cautividad ha sido descrito de forma general en varias instalaciones del Mediterráneo (Lazarri *et al.*, 2000; Pastor *et al.*, 2000). Una de las alternativas probadas con éxito para solucionar este problema ha sido la de recurrir a terapias hormonales que ayuden a completar este proceso. Así Lazarri *et al.* (2000) obtuvieron puestas viables de *S. dumerili* tras la aplicación de sucesivas inyecciones de un análogo de LH-RH, pero el stress inducido en los peces debido al excesivo manejo para el tratamiento hormonal fue elevado. La colocación de implantes de liberación lenta de GnRH α (Mylonas *et al.*, 2004), resultó una práctica más efectiva en esta especie, a la vez que disminuyó ostensiblemente la necesidad de manejo. Así, tras la colocación de implantes hormonales, Mylonas *et al.* (2004) describen puestas viables a las 36 horas, y a los 4 y 5 días posteriores al tratamiento.

Un factor de importancia a considerar en cualquier tipo de alternativa elegida para la reproducción es el comportamiento que *S. dumerili* tiene durante el cortejo nupcial previo al desove. Se ha descrito que varios ejemplares macho cortejan a una única hembra (Tachichara *et al.*, 1993), razón por la cual la proporción de sexos en los tanques de reproducción debería estar teóricamente segada hacia un mayor número de machos. Evidentemente, la posibilidad de desarrollar el cortejo nupcial de una forma más eficaz se aumenta conforme las dimensiones del tanque de cultivo son mayores. En este sentido, Jerez *et al.* (2006) describen la reproducción natural de *S. dumerili* en tanques de 500 m³ en las instalaciones del Instituto Español de Oceanografía en las Islas Canarias, confirmando de esta manera las apreciaciones de autores previos sobre los problemas derivados de elevados parámetros de confinamiento sobre la reproducción de esta especie. Un grupo de diez ejemplares salvajes sin equilibrio de sexos conocido, mantenidos bajo condiciones naturales de temperatura y fotoperiodo, con la única atenuación de la intensidad lumínica, se reprodujo naturalmente después de seis años en cautividad, y alcanzar una talla media de 100 cm y un peso de 25 kg. El periodo de puesta abarcó desde el mes de Abril



hasta Octubre, y en él se produjo un total de 14,3 millones de huevos, con una fertilización media de 61,7 %, y una eclosión del 16,5 %. Esta baja eclosión fue atribuida a una inadecuada alimentación de los reproductores. La mayor amplitud del periodo de puesta registrado en Canarias, en comparación con los obtenidos en otras regiones, parece estar relacionada con un prolongado periodo con temperaturas del agua entre 19 °C y 24 °C, intervalo en el que se produce la puesta de *S. dumerili*. Las puestas registradas por Jerez *et al.* (2006) presentaron una periodicidad de 7 días, situación que concuerda con la existencia de ciclos ovulatorios de esa duración, y mencionados anteriormente para otros autores.

Entre las diversas especies de mero que son objeto acuícola fundamentalmente en latitudes tropicales y subtropicales de todo el mundo, la más característica en aguas españolas es *Epinephelus marginatus*. Al igual que otros Epinefélidos, este mero presenta una sexualidad con un hermafroditismo proterogínico (Marino *et al.*, 2001), produciéndose la primera maduración sexual como hembra en individuos con 5 años de edad, y algo más de 2 kg de peso, mientras que la inversión sexual no ocurre hasta que los peces tienen más de 9 años, y un peso superior a 6 kg (Chauvet 1988). Estas características, unido a un crecimiento no elevado, el complejo comportamiento durante la reproducción (Zabala *et al.*, 1997a), y el status de protección del que goza como especie amenazada, se reflejan en un manejo complicado de la reproducción en cautividad. Es preciso recurrir a la captura de ejemplares jóvenes, que se aclimatan mejor a las condiciones de cautividad pero, a cambio, hay que esperar un largo plazo de tiempo hasta la consecución de ejemplares con talla reproductora, a menos que se recurra a tratamientos hormonales para acelerar el proceso de inversión sexual (Sarter *et al.*, 2006).

En la naturaleza, el desove se extiende desde Mayo hasta Agosto, periodo en el que se producen múltiples puestas de una especie caracterizada por presentar un ovario de maduración por grupos sincrónicos (Marino *et al.*, 2001). El cortejo previo a la puesta es complejo y similar al existente en otros meros, implicando en este caso una ascensión de hasta 12 m en espiral de la pareja (Zabala *et al.*, 1997b). Esta efectúa su puesta, normalmente con el ocaso, cuando alcanza las aguas supe-



riores más cálidas. Durante el periodo de reproducción, aparecen machos dominantes, sobre 100 cm de longitud, que delimitan territorios, alrededor de los cuales se establecen grupos de hembras con tallas entre 50 y 75 cm (Zabala *et al.*, 1997a). Se ha estimado que hasta 7 hembras pueden formar parte del grupo de reproducción en torno al macho dominante.

Una vez adaptados, la tolerancia de esta especie a las condiciones de cautividad es buena. Sin embargo, se ha descrito la existencia de algunas disfunciones reproductoras como el fallo para completar la maduración del ovocito en cautividad (Marino *et al.*, 2000). Ante esta circunstancia, la tendencia general ha sido la búsqueda de tratamientos hormonales, con la pretensión de completar artificialmente lo que las condiciones de confinamiento aparentemente no permiten finalizar. En este sentido, hay que considerar que la estabulación a baja densidad en tanques mas voluminosos, de 100 m³ y 250 m³, es hasta la fecha el único registro en el que se revela la posibilidad de completar el ciclo de maduración del ovocito en cautividad (Bruzón 2004).

Los primeros ensayos para conseguir desarrollar en las hembras el proceso completo de ovogénesis los llevaron a cabo Spedicato *et al.* (1995), quienes evaluaron los efectos de la administración vía inyección de tratamientos a base de HCG y LHRHa, encontrando un efecto positivo de estas hormonas solo cuando los ovocitos presentaban un tamaño superior a 420-650 µm. Marino *et al.* (2000) describen que la administración única de HCG no produce efecto alguno, pero su administración conjuntamente con extractos de pituitaria si les permitió obtener a las 54 horas huevos de buena calidad mediante masaje abdominal. Asimismo, el tratamiento con microesferas de GnRH también se tradujo en múltiples ovulaciones en 13 de 20 hembras tratadas, aunque solo las primeras produjeron huevos viables. Después del tratamiento con GnRH, estimaron un plazo de 68-70 horas como el tiempo más adecuado para proceder al masaje abdominal. En los machos, la aplicación de GnRH aumentó ligeramente la cantidad de semen, pero solo a corto plazo, ya que produjo una rápida regresión posteriormente.

Todos estos procedimientos resultaron excesivamente complejos y permitieron solamente acceder a cantidades muy limitadas de huevos,



que presentaron además nulas o escasas tasas de fertilización y eclosión. Un paso más en el desarrollo de técnicas de control en la reproducción de esta especie viene representado por el uso de implantes de liberación sostenida de GnRHa, que ha permitido incrementar la eficacia del proceso de inducción hormonal de la maduración final ovocitaria (Marino *et al.*, 2003). Estos autores trataron solamente hembras en vitelogénesis, con diámetros de ovocito de 300-350 μm , durante el periodo de maduración natural, consiguiendo con este método completar la maduración en cautividad en un 85 % de los ejemplares tratados, con una media de 3,8 ovulaciones por individuo y una fecundidad relativa de 118,3 103 huevos kg^{-1} . Los huevos fueron obtenidos mediante masaje abdominal en todos los casos, tras un plazo de 137 horas y alcanzar un tamaño de 800-850 μm , y fertilizados con esperma refrigerado extraído de machos que no recibieron tratamiento alguno. Las tasas de fertilización y eclosión registradas fueron del 48,2 % y 52,2 %, respectivamente, indicando también que las dosis más altas de la hormona experimentadas en su trabajo estuvieron asociadas con la consecución de los huevos de peor calidad. Muy recientemente, se han obtenido puestas espontáneas de reproductores de *E. marginatus*, procedentes de tanques voluminosos, e inducidos con GnRHa (Bruzón, en preparación).

Como se mencionó anteriormente, una de las peculiaridades del trabajo relacionado con la reproducción de los meros en general es la necesidad de conseguir adelantar la inversión sexual para la consecución de machos funcionales. Para ello se recurre a la administración de 17- α metiltestosterona en aquellos individuos que se pretenden masculinizar. La inclusión de 5 mg kg^{-1} de esta hormona en el alimento de juveniles o hembras de *E. marginatus*, facilitó la consecución de machos funcionales al cabo de un periodo de cuatro meses de tratamiento en individuos solo a partir de 1,5 kg de peso (Glamuzina *et al.*, 1988). Estos peces produjeron esperma viable, aunque en pequeñas cantidades. Resultados similares fueron obtenidos mediante la administración oral o por inyecciones de 17- α metiltestosterona al cabo de 14 semanas (Marino *et al.*, 2000). Sin embargo, en este caso se cita como a los seis meses de cesar el tratamiento hormonal, los peces retornaron al estado sexual femenino. La aplicación de esta hormona de



masculinización a través de implantes de liberación sostenida con una periodicidad mensual facilitó la consecución de machos al cabo de 12 semanas de tratamiento (Sarter *et al.*, 2006). Este proceso fue conseguido además con peces de un año y 0,13 kg de peso, y durante el año siguiente al tratamiento no se observó reversión sexual alguna.

9.6. IMPORTANCIA DE LA REPRODUCCIÓN DENTRO DEL CICLO INTEGRAL DE PRODUCCIÓN DE NUEVAS ESPECIES

En los tres apartados anteriores se plasma la existencia de un relativamente amplio soporte tecnológico documentado sobre la reproducción en cautividad de varias especies de peces marinos con potencial uso acuícola. Evidentemente, el nivel de conocimiento y la capacidad de control derivada de este, son parámetros con desarrollo variable en función de la complejidad de la especie. No obstante, hasta en el más complicado de los casos, como podría considerarse el del atún rojo, existen métodos descritos y contrastados para la obtención de huevos fertilizados a partir de reproductores estabulados en cautividad, si bien se trata de sistemas no aplicados en España. El acceso por lo tanto a la reproducción en cautividad de estos peces pasa por una rigurosa aplicación de los conocimientos adquiridos por diferentes investigadores, y eso es algo que, en ocasiones, resulta excesivamente complejo de acometer, o bien su correcta adaptación requiere elevadas inversiones, que no compensan de momento las expectativas de posibles inversores. Hay que tener presente también que muchas de las referencias aquí citadas son muy recientes, y por lo tanto su aplicación en centros de producción no ha tenido tiempo suficiente para desarrollarse. Sin embargo, llama la atención el desarrollo de la reproducción en cautividad de *A. regius* por centros privados de producción en Francia, sin la existencia previa de una investigación pública al respecto.

De forma general, se observa para la mayoría de las especies tratadas una predominancia de resultados de manejo destinados a la reproducción, mientras que los estudios fisiológicos para acceder a un mayor grado de control sobre la misma han producido menor cantidad de información con aplicación rápida. Esta es una situación ini-



cialmente esperable, dada la evolución actual y la secuencia lógica de desarrollo en esta materia, siendo previsible que en un plazo medio de tiempo, las nuevas investigaciones deriven en un notable refuerzo de la información sobre mecanismos más específicos para el control de la reproducción en nuevas especies de peces marinos. Con el nivel actual de conocimientos, resultaría teóricamente posible desarrollar sistemas de cultivo, con reducida o nula inferencia fisiológica sobre los peces, para la obtención de huevos adecuadamente fertilizados en la práctica totalidad de las especies aquí descritas. Eso sí, los sistemas han de ser creados para respetar las necesidades de espacio, ambiente, alimentación y calidad de agua, deducidas para cada especie a partir de la información generada al respecto. En este sentido, durante mucho tiempo, y todavía en la actualidad, la reproducción natural, dentro de un entorno de manejo ambiental de la temperatura y el fotoperiodo, ha sido el planteamiento principalmente seguido por la industria acuícola española para abastecer los criaderos con huevos fertilizados de las especies más consolidadas en la industria. Respecto de las terapias hormonales para la inducción a la puesta en nuevas especies, es probable que sean de mayor, menor o nula utilidad en función de la biología de la reproducción de las mismas, pudiéndose aventurar algo a este respecto de acuerdo a los resultados recogidos hasta la fecha, y previamente sintetizados. Evidentemente aún son necesarios más esfuerzos de investigación en el conocimiento básico de la fisiología de la reproducción, que pongan de manifiesto la viabilidad biológica, económica y sobre la calidad de la puesta, de estos tratamientos.

A pesar de la necesidad de avanzar todavía bastante en el conocimiento sobre la reproducción de peces marinos de interés acuícola, es preciso incidir en el hecho de que la reproducción no limita de una forma total el dominio del ciclo productivo completo de las especies aquí consideradas. Existen otros aspectos del ciclo de cultivo que hoy día pueden ser responsables en mayor medida de la ausencia de una producción integral extendida y de carácter comercial. En el caso de los espáridos, se aprecia un nivel ciertamente asequible para la obtención de huevos fertilizados en las varias especies aquí consideradas, situándose en algunos casos en un nivel zootécnico similar al de la dorada. Especial desarrollo se ha alcanzado sobre el conocimiento de la repro-



ducción en cautividad de *D. dentex*. Sin embargo, la producción acuícola de esta especie es inexistente. En términos globales, la producción de espáridos diferentes a la dorada es muy limitada. Las causas específicas de esta situación trascienden los objetivos de esta revisión, pero de forma general habría que citar aspectos como una menor eficiencia en el cultivo larvario, problemas con la calidad o aspecto final del producto terminado, o la simple dificultad para encontrar un mercado lo suficientemente amplio, como motivos que en estos momentos son más limitantes que la reproducción.

La reproducción en cautividad de *S. senegalensis* si ha sido durante muchos años el principal factor condicionante en el cultivo de este lenguado en España. La circunstancia de que el estudio de su cultivo estuvo restringido al sur oeste ibérico durante muchos años, con una única instalación accediendo a su reproducción en cautividad en España, ralentizó en buena medida la extensión de esta actividad hasta el inicio del nuevo milenio. A partir del año 2000, tras la iniciativa de la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR) para llevar a cabo un Plan Nacional para el cultivo del lenguado, se iniciaron diversos estudios enfocados prioritariamente para desarrollar la reproducción en cautividad del lenguado en diversos puntos de la geografía nacional. Después de unos años de aplicación y adaptación de los métodos zootécnicos conocidos en el sur, se contabiliza en la actualidad un total de once instalaciones, públicas y privadas, que han sido capaces de producir huevos fertilizados de *S. senegalensis* a lo largo del litoral ibérico. Los métodos de reproducción disponibles hasta el momento muestran todavía un reducido grado de control sobre la misma, y los ensayos de tratamiento hormonal efectuados hasta la fecha, que pudieran incrementar este nivel de control, apenas han dado resultados positivos. Sin embargo, el dilatado periodo de tiempo durante el cual esta especie puede reproducirse en cautividad mediante manipulación sencilla de la temperatura, compensa en buena parte la carencia de procedimientos más sofisticados para regular su reproducción por el momento. Independientemente del estado en el desarrollo de su reproducción en cautividad, la realidad actual indica que la disponibilidad de huevos fertilizados en los criaderos de peces marinos españoles no representa una limitación principal para la producción comercial de *S. senegalensis*.



sís. Sin embargo, el tonelaje de producción de esta especie no aumenta significativamente, debido a la aparición de nuevos condicionantes relacionados con otras etapas del cultivo, fundamentalmente la insistente incidencia de enfermedades de carácter oportunista durante el engorde, que han venido a desplazar a la reproducción del papel principal que a lo largo de muchos años ejerció como auténtico cuello de botella en el desarrollo de la acuicultura del lenguado.

Una de las conclusiones más evidentes por el momento que pueden deducirse de los trabajos realizados con los peces de mayor talla estudiados hasta la fecha, es la necesidad de grandes espacios en las instalaciones utilizadas para el confinamiento de los ejemplares reproductores, tanto para el desarrollo de su maduración gonadal, como para la realización de la puesta. Los resultados más recientes son particularmente claros en los casos de *S. dumerili* y *T. thynnus*. En ambas especies, la obtención de huevos procedentes de puestas naturales depende de grandes infraestructuras de estabulación, circunstancia que condiciona notablemente el desarrollo acuícola de estas especies. Los pobres resultados obtenidos durante su desarrollo temprano están relacionados con la elevada tasa de crecimiento y los altos requerimientos energéticos que ello conlleva. Las técnicas actualmente disponibles de alimentación larvaria no son adecuadas para satisfacer con éxito tales demandas.

Una situación diferente se encuentra para *A. regius* y *E. marginatus*, especies cuyas técnicas de alevinaje rinden resultados más satisfactorios. La reproducción en cautividad es por consiguiente más determinante para el dominio de los procedimientos acuícolas que llevan al control de su ciclo productivo, aunque como ya se ha visto no representa una barrera absoluta. Sencillamente se trata de una actividad en la que es necesario invertir un esfuerzo en infraestructuras de cultivo y manejo, tanto ambiental como de tratamiento hormonal, superior al que se ha estado utilizando en la reproducción de peces marinos.

9.7. OPCIONES Y EXPECTATIVAS DE FUTURO

La diversificación en el dominio de técnicas para la piscicultura marina puede ser contemplada bien desde una perspectiva estrictamente científica o, bajo un aspecto específico de producción industrial. En el



primer caso, la existencia de un conocimiento extendido a gran número de especies es tanto deseado como obligado. Por otro lado, es a partir de este amplio marco de conocimiento de donde suele surgir una tecnología más restringida a un número mas reducido de especies, que centran la actividad industrial acuícola. Sin embargo, cuando el recurso económico es limitado y el objetivo es el de ampliar la lista de especies que configuran el panorama de la producción piscícola, lo razonable puede ser evolucionar de manera secuencial, pero con tenacidad y constancia, concentrando los esfuerzos en pocas especies bien identificadas como prioritarias en base a su demanda de mercado. En un símil con uno de los mecanismos de reproducción citados, puede ser que lo más razonable en la consecución de tecnologías completas para la producción de nuevas especies evolucionara de una manera parecida a la que lo hace el mecanismo de desove de aquellos peces que liberan sus huevos maduros de forma sincrónica por grupos.

El avance de la tecnología acuícola de la reproducción ha sido mayor en la faceta zootécnica. Quizás sea aún temprano para hablar de métodos contrastados sobre terapias hormonales. Es de esperar que en el futuro a corto o medio plazo, y como una continuación de la secuencia lógica en el proceso de desarrollo acuícola, se consoliden mejor los diferentes sistemas para el control endocrino de la reproducción así como las técnicas de reproducción artificial. Aquellos podrán avanzar mucho mejor, respecto de cómo lo han hecho hasta el presente, una vez que se dominen los aspectos básicos de estabulación de los peces y se cubran los requerimientos mínimos según las características biológicas de estos. Los métodos para la compensación artificial de aquellas hormonas sexuales cuyos niveles se vean afectados por las condiciones de cautividad deberán evolucionar también de acuerdo a un conocimiento detallado sobre el grado de afectación en cada especie, una vez se hayan definido las condiciones mas adecuadas de estabulación de los reproductores. Dichos métodos deberán contemplar el uso de mecanismos para la liberación lenta y sostenida de hormonas, dada la mayor eficiencia de estos y el menor estrés asociado al manejo derivado de una menor frecuencia de manipulación de los ejemplares. A la vista de los resultados aquí revisados, no todas las especies necesitan ayuda hormonal para desovar abundantemente en cautividad. De hecho, en la reproducción de las tres especies de peces que configuran



la producción apenas se utiliza esta metodología. Por ello, es evidente que será preciso identificar muy bien cuales de las nuevas especies están necesitadas de este tipo de tratamientos, y en que aspectos específicos hay que incidir, y abordar en ellas estudios amplios sobre la fisiología de su reproducción en cautividad.

Por último, la capacidad para poder efectuar la reproducción artificial, es algo irrenunciable para toda aquella especie que sea fijada como objetivo acuícola. Aunque no llegue a ser el método principal para la obtención masiva de huevos en los criaderos, su control es esencial para la realización de programas de selección genética. Aunque esta sea todavía una faceta por desarrollar incluso en especies como dorada y lubina, debe de estar siempre en el horizonte cuando se acomete la puesta a punto del cultivo de cualquier nueva especie. Por lo tanto, actuaciones en el campo de la obtención manual de gametos viables, así como técnicas para su conservación y/o criopreservación habrán de ser seriamente consideradas para facilitar los necesarios cruces dirigidos que todo proceso de mejora genética requiere. Es muy probable que cuando cinco o seis especies hayan alcanzado este nivel zootécnico podremos pensar que la piscicultura marina española habrá llegado a un primer estado de madurez. Si esta reflexión se contrasta con el número total de especies mencionadas en esta revisión, sea el lector quien genere reflexiones adicionales.

BIBLIOGRAFÍA

- ABASCAL, F.J., G. MEGINA, and A. MEDINA, 2003 Histological and stereological assessment of batch fecundity, spawning frequency and maturation of female Atlantic bluefin tuna around the Balearic Islands. *Cahiers Options Méditerranéennes* 60: 13-14.
- ABELLÁN, E., A. GARCÍA-ALCÁZAR, M. ARIZCUN, J. DELGADO, and P. MARTÍN, 1997 Experiencias preliminares sobre reproducción y cultivo de dentón (*Dentex dentex* L.). pp. 477-482 in *Actas del VI Congreso Nacional de Acuicultura*, edited by J. De Costa, E. Abellán, B. García, A. Ortega, and S. Zamora. 9-11 Julio 1997, Cartagena.
- ABELLÁN, E., 2000 Culture of common dentex (*Dentex dentex* L.): Present knowledge, problems and perspectives. *Cahiers Options Méditerranéennes* 47: 157-168.



- AGULLEIRO, M.J., V. ANGUIS, J.P. CAÑAVATE, G. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, C.C. MYLONAS, and J. CERDÀ, 2006 Induction of spawning of captive-reared Senegal sole (*Solea senegalensis*) using different administration methods for gonadotropin-releasing hormone agonist. *Aquaculture* 257: 511-524.
- ANGUIS, V., and J.P. CAÑAVATE, 2005 Spawning of captive Senegal sole (*Solea senegalensis*) under a naturally fluctuating temperature regime. *Aquaculture* 243: 133-145.
- BAYNES, S.M., B.R. HOWELL, and T.W. BEARD, 1993 A review of egg production by captive sole, *Solea solea* (L.). *Aquaculture and Fisheries Management* 24: 171-180.
- BAYNES, S.M., B.R. HOWELL, T.W. BEARD, and J.D. HALLAM, 1994 A description of spawning behaviour of captive Dover sole, *Solea solea* (L.). *Netherlands Journal of Sea Research* 32: 271-275.
- BERTOTTO, D., A. LIBERTINI, A. BARBARO, and A. FRANCESCON, 2005 Successful switching of spawning in captive common sole (*Solea solea*) by a long-acting GnRH agonist. *European Aquaculture Society Special Publication* 34: 164-165.
- BRUZÓN, M.A., 2004 Cultivo del mero *Epinephelus marginatus* (Loewe, 1834). Bases biológicas para su reproducción en cautividad. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz. 228 pp.
- CABRITA, E., F. SOARES, and M.T. DINIS, 2006 Characterization of Senegalese sole, *Solea senegalensis*, male broodstock in terms of sperm production and quality. *Aquaculture* 261: 967-975.
- CAÑAVATE, J.P., 2005 Opciones del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) para diversificar la acuicultura marina. En: *Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura*, 17-21 Octubre 2005. Gandia, pp. 340-347.
- CAÑAVATE, J.P., V. ANGUIS, A. CALVO, and M. MANCHADO, 2005 Recent developments in the reproduction of the Senegal sole (*Solea senegalensis*) in captivity. *European Aquaculture Society Special Publication* 35: 154-155.
- CÁRDENAS, S., E. REVILLA, J. MÉNDEZ, A. CALVO, and J.P. CAÑAVATE, 2002 Descripción de una instalación nueva para el cultivo en circuito cerrado de atunes. I Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2002. (<http://www.civa2002.org>). pp. 6-17.
- CÁRDENAS, S., and A. CALVO, 2003 Reproducción en el mar y en cautividad del Pargo Común o Bocinegro, *Pagrus pagrus* (Pisces: Sparidae). II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. CIVA 2003. (<http://www.civa2003.org>). pp. 468-480.
- CÁRDENAS, S., J.P. CAÑAVATE, A. SANCHEZ-LAMADRID, and J.M. NARANJO, 2003 Domesticación de la hurta (*Pagrus auriga*). En: *Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura*. 12-16 Mayo 2003. Cádiz, pp. 393-394.



- CÁRDENAS, S., I. LOZANO, and N. GARCÍA, 2005 Producción de huevos de bocinero (*Pagrus pagrus*) y hurta (*Pagrus auriga*) en cautividad. En: Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura, 17-21 Octubre 2005. Gandia, pp. 494-495.
- CARRILLO, M., and S. ZANUY, 1993 Fisiología de la reproducción: Fisiología de la reproducción de los Teleósteos, pp: 125-142 in *Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción*, edited by F. Castelló Orvay. Universidad de Barcelona.
- CHAUVET, C., 1988 Study of the growth of the grouper *Epinephelus guaza* (Linnaeus, 1758) from the Tunician coasts. *Aquat. Living Resour.* 1: 277-288.
- CORRIERO, A., S. DESANTIS, M. DEFLORIO, F. ACONE, C.R. BRIDGES, J.M. DE LA SERNA, P. MEGALOFONOU, and G. DE METRIO, 2003 Histological investigation on the ovarian cycle of the bluefin tuna in the western and central Mediterranean. *J. Fish Biol.* 63: 108-119.
- CORRIERO, A., G. DE METRIO, F. ABASCAL, and A. MEDINA, 2006 Effects of GnRHA administration on the gonads of captive-reared Atlantic Bluefin Tuna *Thunnus thynnus thynnus*. *European Aquaculture Society Pub-167*: 191.
- DEVAUCHELLE, N., J.C. ALEXANDRE, N. LE CORRE, and Y. LETTY, 1987 Spawning of Sole (*Solea solea*) in captivity. *Aquaculture* 66: 125-147.
- DINIS, M.T., 1986 Quatre Soleidae de l'Estuaire du Tage. Reproduction et Croissance. Essai d'élevage de *Solea senegalensis* Kaup 1858. Thèse d'Etat Sciences Naturelles, Université de Bretagne Occidentale, Francia.
- DINIS, M.T., L. RIBEIRO, F. SOARES, and C. SARASQUETE, 1999 A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture* 176: 27-38.
- DIVANACH, P., 2002 Recent development in the domestication of new Mediterranean species. *European Aquaculture Society Special Publication* 32: 35-41.
- DUJAKOVIC, J. J., and B. GLAMUZINA, 1988 Preliminary studies of reproduction and early life history of *Diplodus vulgaris* (E. Geoffroy Saint-Hilaire 1817) in captivity. *Aquaculture* 69, 367-377.
- FARANDA, F., A. CAVALIERE, G. LO PARO, A. MANGANARO, and A. MAZZOLA, 1985 Preliminary studies on reproduction of *Puntazzo puntazzo* (Gmelin 1789) (Pises, Sparidae) under controlled conditions. *Aquaculture* 49: 111-123.
- FAUVEL, C., F. J. ABASCAL CRESPO, F. DE LA GANDARA, M. SUQUET, and J. COSSON, 2006 Bluefin tuna *Thunnus thynnus thynnus* gamete maturation after hormonal induction. *European Aquaculture Society Pub 167*: 302.
- FERNÁNDEZ-PATO, C.A., C. MARTÍNEZ-TAPIA, O. CHEREGUINI, and I. GARCÍA-BANDA, 1990 Spawn, hatching and larvae rearing of black-spot sea bream (*Pagellus bo-*



- garaveo B.). First experiences in the Oceanographic Center of Santander (Spain) in order to its culture. ICES CM 1990/F30.
- FORES, R., M. SAMPER, J. R. CEJAS, F. J. SANTAMARIA, J. E. VILLAMANDOS, and S. JEREZ, 2000 Acclimatization of tuna fish to on-land facilities. *Cahiers Options Méditerranéennes* 47: 287-294.
- GARCÍA-GÓMEZ, A., F. DE LA GÁNDARA, T. RAJA, and Atunes de mazarrón S.L., 2003 First experience on adult bluefin tuna (BFT), *Thunnus thynnus*: Transportation from rearing cages to inland facilities. *Cahiers Options Méditerranéennes* 60: 77-79.
- GARCÍA-LÓPEZ, A., V. ANGUIS, E. M. SHAW, C. SARASQUETE, J. P. CAÑAVATE, and G. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2003 Perfiles de esteroides sexuales durante el ciclo reproductor de *Solea senegalensis* (Pises, Soleidae) bajo diferentes condiciones ambientales de cultivo. IV Congreso de la Asociación Ibérica de Endocrinología Comparada (AIEC). Libro de resúmenes. Córdoba, Septiembre 2003.
- GARCÍA-LÓPEZ, A., G. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, and C. SARASQUETE, 2005 Male reproductive system in Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup): anatomy, histology and histochemistry. *Histol. Histopathol.* 20: 1179-1189.
- GARCÍA-LÓPEZ, A., E. PASCUAL, C. SARASQUETE, and G. MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2006 Disruption of gonadal maturation in cultured Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup by continuous light and/or constant temperature regimes. *Aquaculture* 261: 789-798.
- GEORGIU, G., and D. STEPHANOU, 1995 Contribution to the study of maturation and spawning problems of the sharpnose seabream (*Puntazzo puntazzo*). *Cahiers Options Méditerranéennes* 16: 47-50.
- GLAMUZINA, B., N. GLAVIC, B. SKARAMUCA, and V. KOZUL, 1998 Induced sex reversal of dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe). *Aquaculture Research* 29: 563-567.
- GLAMUZINA, B., J. JUG-DUIJAKOVIC, and I. KATAVIC, 1989 Preliminary studies on reproduction and larval rearing of common dentex, *Dentex dentex* (Linnaeus 1758). *Aquaculture* 77: 75-84.
- GRAU, A., 1992 Aspectos histológicos, ciclo reproductor y principales procesos patológicos de *Seriola dumerilii*, Risso 1810 (Carangidae). Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona. 451 pp.
- GRAU, A., B. MORALES-NIN, A. QUETGLAS, F. RIERA, E. MASSUTI, and E. PASTOR, 2001 El modelo reproductivo del dentón *Dentex dentex* (L): bisexualidad juvenil y gonocorismo tardío. pp. 555-560 in *Convergencia entre Investigación y Empresa: un reto para el Siglo XXI*, Vol. 4. Serie Monografías del ICCM, edited by Fernández-Palacios, H., and M. Izquierdo.



- GUZMÁN, J.M., E. MARULL, J. RAMOS, C.C. MYLONAS, V. OLMOS, and E. MAÑANÓS, 2005 Inducción hormonal a la puesta del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) mediante la administración de sistemas GnRHa de liberación sostenida. En: Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura, 17-21 Octubre 2005. Gandia, pp. 490-491.
- HACHERO, I., M. HERRERA, J. F. FERRER, J. M. MÁRQUEZ, M. ROSANO, A. RODILES, and J. I. NAVAS, 2005 Resultados preliminares sobre la reproducción y el cultivo larvario de parracho (*Scophthalmus rhombus* Linneo, 1758). En: Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura, 17-21 Octubre 2005. Gandia, pp. 492-493.
- HERNÁNDEZ, M.D., M.A. EGEA, F. M. RUEDA, F. J. MARTÍNEZ, and B. GARCÍA GARCÍA, 2003 Seasonal condition and body composition changes in sharpnout seabream (*Diplodus puntazzo*) raised in captivity. *Aquaculture* 220: 569-580.
- HERRERA, M., I. HACHERO, J. F. FERRER, J. M. MÁRQUEZ, M. ROSANO, and J. I. NAVAS, 2005 Primeros datos sobre el cultivo de la acedía (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881). En: Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura, 17-21 Octubre 2005. Gandia, pp. 352-353.
- LOKA, C., K. KANI, and H. NHHALA, 2000 Present status and prospects of technical development of tuna sea-farming. *Cahiers Options Méditerranéennes* 47: 275-285.
- JEREZ, S., M. SAMPER, F. J. SANTAMARÍA, J. E. VILLAMANDOS, J. R. CEJAS, and B. C. FELIPE, 2006 Natural spawning of greater amberjack (*Seriola dumerili*) kept in captivity in the Canary Islands. *Aquaculture*: 252, 199-207.
- KOKOKIRIS, L., S. BRUSLE, M. KENTOURI, and A. FOSTIER, 1999 Sexual maturity and hermaphroditism of the red porgy *Pagrus pagrus* (Teleostei: Sparidae). *Mar. Biol.* 134: 621-629.
- KOLIOS, P., S. KIRITSIS, and N. KATRIBUSAS, 1997 Larval-rearing and growout of the red porgy (*Pagrus pagrus*) in the Riopesca hatchery (Greece). *Hydrobiologia* 358: 321-325.
- LAZZARI, A., A. FUSARI, A. BOGLIONE, G. MARINO, and M. DI FRANCESCO, 2000 Recent advances in reproductional and rearing aspects of *Seriola dumerilii*. *Cahiers Options Méditerranéennes* 47: 241-247.
- LOIR, M., F. LE GAC, S. SOMARAKIS, and M. PAVLIDIS, 2001 Sexuality and gonadal cycle of the common dentex (*Dentex dentex*) in intensive culture. *Aquaculture* 194: 363-381.
- MACHIAS, A., N. TSIMENIDES, L. KOKOKIRIS, and P. DIVANACH, 1998 Ring formation on otoliths and scales of *Pagrus pagrus*: a comparative study. *J. Fish Biol.* 52: 350-361.
- MANCHADO, M., M. PONCE, E. ASENSIO, C. INFANTE, R. DE LA HERRÁN, F. ROBLES, M. GARRIDO, M. RUIZ REJÓN, and S. CÁRDENAS, 2005 PAGURTA, híbrido interespecífico



- de pargo, *Pagrus pagrus*, (♀) x hurta, *Pagrus auriga*, (♂): caracterización fenotípica y molecular. En: Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura, 17-21 Octubre 2005. Gandia, pp. 440-441.
- MARINO, G., A. MANDICH, A. MASSARI, F. ANDALORO, S. PORRELLO, M.G. FINOIA, and F. CEVASCO, 1995 Aspects of reproductive biology of the Mediterranean amberjack (*Seriola dumerili* Risso) during spawning period. J. Appl. Ichthyol. 11: 9-24.
- MARINO, G., E. AZZURRO, M.G. FINOIA, M.C. MESSINA, A. MASSARI, and A. MANDICH, 2000 Recent advances in induced breeding of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). Cahiers Options Méditerranéennes 47: 215-225.
- MARINO, G., E. AZZURRO, A. MASSARI, M.G. FINOIA, and A. MANDICH, 2001 Reproduction in the dusky grouper from the southern Mediterranean. J. Fish Biol. 58: 909-927.
- MARINO, G., E. PANINI, A. LONGOBARDI, A. MANDICH, M.G. FINOIA, Y. ZOHAR, and C.C. MYLONAS, 2003 Induction of ovulation in captive reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) with a sustained-release GnRHa implant. Aquaculture 219: 841-858.
- MEDINA, A., 2003 Reproductive status of bluefin tuna during migration to Mediterranean spawning grounds through the Straits of Gibraltar. Cahiers Options Méditerranéennes 60: 117-122.
- MANDICH, A., A. MASSARI, S. BOTTERO, P. PIZZICORI, H. GOOS, and G. MARINO, 2004 Plasma sex steroid and vitellogenin profiles during gonad development in wild Mediterranean amberjack (*Seriola dumerili*). Mar. Biol. 144: 127-138.
- MARANGOS, C., 1995 Larviculture of the sheepshead bream, *Puntazzo puntazzo* (Gmelin 1789) (Pisces, Sparidae). Cahiers Options Méditerranéennes 16: 41-46.
- MÉNDEZ, E., P. ANASTASIADIS, M. KENTOURI, M. PAVLIDIS, and P. DIVANACH, 1995 Preliminary data on spawning activity of five mediterranean teleost species kept in captivity, in Crete (Greece), pp. 398-403 in Actas del V Congreso Nacional de Acuicultura, edited by Castelló, F., and A. Calderer, Sant Carles de la Ràpita,.
- MICALE, V., F. PERDICHIZZI, and G. BASCIANO, 1996 Aspects of the reproductive biology of the sharpsnout seabream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). Gametogenesis and gonadal cycle in captivity during the third year of life. Aquaculture 140: 281-291.
- MICALE, V., G. MARICCHIOLO, and L. GENOVESE, 1999 The reproductive biology of the amberjack, *Seriola dumerili* (Risso 1810): I. Oocyte development in captivity. Aquac. Res. 30: 349-355.



- MICALE, V., G. MARICCHIOLO, and L. GENOVESE, 2002 The reproductive biology of blackspot sea bream *Pagellus bogaraveo* in captivity. I. gonadal development, maturation and hermaphroditism. J. Appl. Ichthyol. 18: 172-176.
- MIHELAKAKIS, A., T. YOSHIMATSU, and C. TSOLKAS, 2001 Spawning in captivity and early life history of cultured red porgy, *Pagrus pagrus*. Aquaculture 199: 333-352.
- MIYASHITA, S., O. MURATA, Y. SAWADA, T. OKADA, Y. KUBO, Y. ISHITANI, M. SEOKA and H. KUMAI, 2000 Maturation and spawning of cultured bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. Suisanzoshoku 48: 475-488.
- MORALES-NIN, B., and J. MORANTA, 1997 Life history and fishery of the common dentex (*Dentex dentex*) in Mallorca (Balearic Islands, western Mediterranean). Fish. Res. 30: 67-76.
- MORATO, T., P. AFONSO, P. LOURINHO, R.D.M. NASH, and R.S. SANTOS, 2003 Reproductive biology and recruitment of the white sea bream in the Azores. J. Fish Biol. 63: 59-72.
- MYLONAS, C.C., M. PAPADAKIA, M. PAVLIDIS, and P. DIVANACH, 2004 Evaluation of egg production and quality in the Mediterranean red porgy (*Pagrus pagrus*) during two consecutive spawning seasons. Aquaculture 232: 637-649.
- MYLONAS, C.C., N. PAPANDROULAKIS, A. SMBOUKIS, M. PAPADAKI, and P. DIVANACH, 2004 Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumeril*) using GnRHa implants. Aquaculture 237: 141-154.
- MYLONAS, C.C., C. BRIDGES, A. BELMONTE, C. FAUVEL, A. GARCÍA, Y. ZOHAR, H. ROSENFIELD, A. MEDINA, A. CORRIERO, G. DEMETRIO, R. VASSALLO-AGIUS, and H. GORDIN, 2006 Induction of ovulation and production of viable larvae of bluefin tuna *Thunnus thynnus* using GnRHa implants. European Aquaculture Society Pub-167: 644.
- OLMEDO, M., J.B. PELETEIRO, B. ALVAREZ-BLAZQUEZ, and C. GÓMEZ, 1998 First experiences with larval culture of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). ICES CM 1998/L21.
- PAJUELO, G.C., and J.M. LORENZO, 1996 Life history of the red porgy *Pagrus pagrus* (Teleostei: Sparidae) of the Canary islands, central east Atlantic. Fish. Res. 28: 163-177.
- PAJUELO, J.G., J. SOCORRO, J.A. GONZÁLEZ, J.M. LORENZO, J.A. PÉREZ-PEÑALVO, I. MARTÍNEZ, and C.M. HERNÁNDEZ-CRUZ, 2006 Life history of the red-banded seabream *Pagrus auriga* (Sparidae) from the coasts of the Canarian archipelago. J. Appl. Ichthyol. 22: 430-436.
- PASTOR, E., A. GRAU, E. MASSUTI, R. SALA, and C. SANPERA, 1997 Aspectos reproductivos, desarrollo embrionario y larvario del dentón, *Dentex dentex* bajo condiciones controladas. pp. 429-435 in Actas del VI Congreso Nacional de



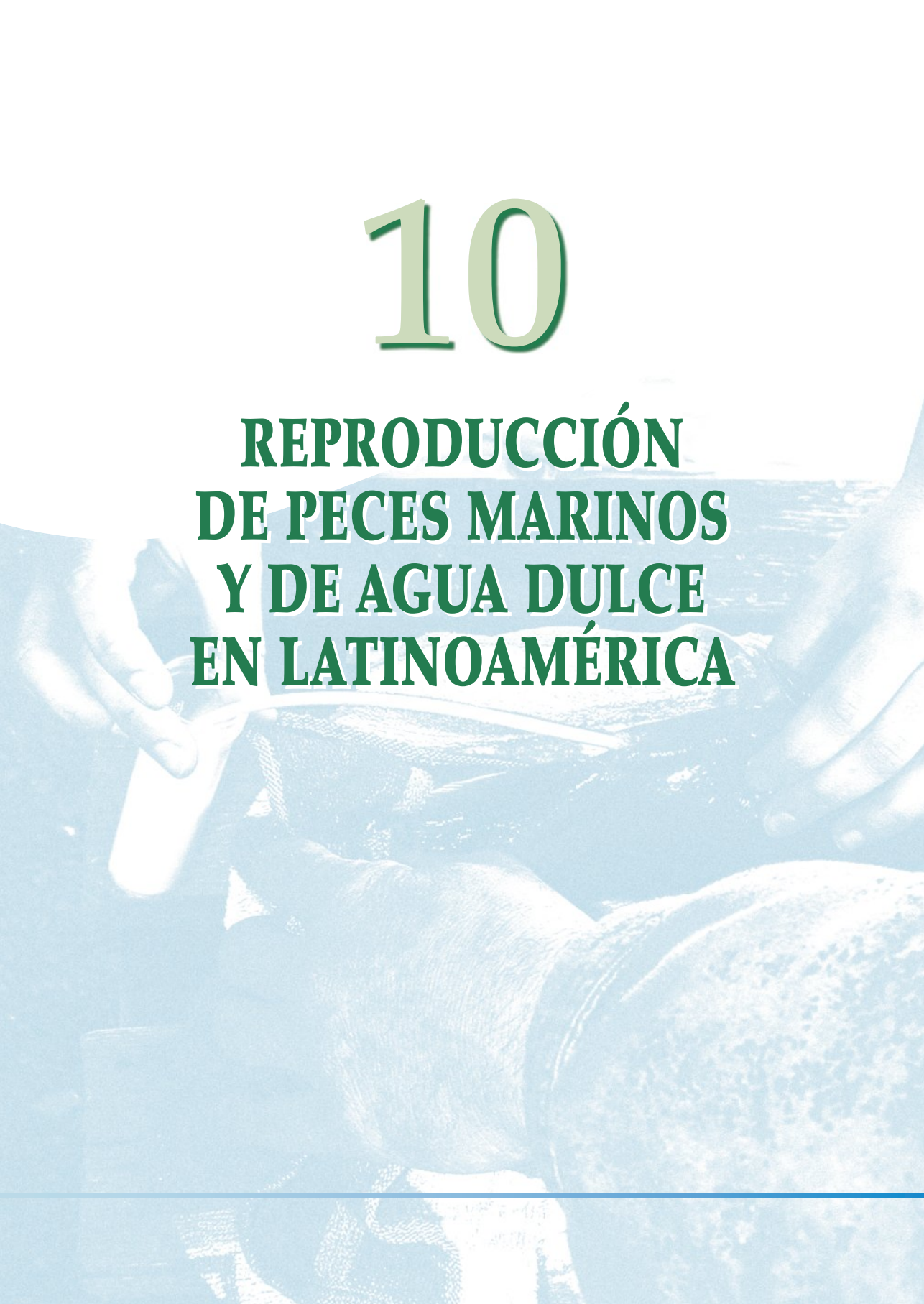
- Acuicultura, edited by J. De Costa, E. Abellán, B. García, A. Ortega, and S. Zamora, 9-11 Julio 1997, Cartagena,.
- PASTOR, E., A. GRAU, F. RIERA, S. POU, E. MASSUTI, and A.M. GRAU, 2000 Experiences in the culture of new species in the "Estacion de Acuicultura" of the Balearic Government (1980-1998). *Cahiers Options Méditerranéennes* 47: 371-379.
- PAVLIDIS, M., M. LOIR, A. FOSTIER, H. MÖLSÄ, and A. SCOTT, 2000 Recent advances in reproductional aspects of *Dentex dentex*. *Cahiers Options Méditerranéennes* 47: 169-176.
- PAVLIDIS, M., S. KERAVEC, L. GREENWOOD, B. MOUROT, and A.P. SCOTT, 2001 Reproductive performance of common dentex, *Dentex dentex*, broodstock held under different photoperiod and constant temperature conditions. *Fish Physiol. Biochem.* 25: 171-180.
- PELETEIRO, J. B., M. OLMEDO, and B. ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, 2000 Culture of *Pagellus bogaraveo*: present knowledge, problems and perspectives. *Cahiers Options Méditerranéennes* 47: 141-151.
- PELETEIRO, J. B., M. OLMEDO, F. LINARES, B. ÁLVAREZ-BLÁZQUEZ, and F.J. URBIETA, 2000 Blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*): a valid alternative to turbot culture (*Scophthalmus maximus* L.). p. 551 in *Aqua2000: Responsible Aquaculture in the New Millennium*. EAS Special Publication no. 28, edited by R. Flos, and R. Creswell.
- QUERO, J.C., and J.J. VAYNE, 1993 Nouvel indice sur les pérégrinations du maiigre. *Annales de la Société des sciences naturelles de la Charente-Maritime* 8(2): 127-128.
- RAMOS, J., 1986a Luteinizing hormone-releasing hormone analogue (LH-RH) induces precocious ovulation in common sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture* 54: 185-190.
- RAMOS, J., 1986b Induction of spawning in common sole (*Solea solea* L.) with human chorionic gonadotropin (HCG). *Aquaculture* 56: 239-242.
- RODRÍGUEZ, R. B., 1984 Biología y cultivo de *Solea senegalensis* Kaup 1858 en Golfo de Cádiz. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, 207 pp.
- SARTER, K., M. PAPADAKI, S. ZANUY, and C.C. MYLONAS, 2006 Permanent sex inversion in 1-year-old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17 α -methyltestosterone implants. *Aquaculture* 256: 443-456.
- SAWADA, Y., T. OKADA, S. MIYASHITA, O. MURATA, and H. KUMAI, 2005 Completion of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel) life cycle. *Aquac. Res.* 36: 413-421.



- SPEDICATO, M.T., G. LEMBO, P. DI MARCO, and G. MARINO, 1995 Preliminary results in the breeding of dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). Cahiers Options Méditerranéennes 16: 131-148.
- TACHIARA, K., R. EBISU, and Y. TUKASHIMA, 1993 Spawning, eggs, larvae and juveniles of the purplish amberjack *Seriola dumerilii*. Bulletin of the Japanese Society of Science and Fisheries 59: 1479-1488.
- VASSILOPOULOU, V., and C. PAPAConstantinou, 1992 Age, growth and mortality of the red porgy, *Pagrus pagrus*, in the Eastern Mediterranean Sea (Dodecanese, Greece). Vie Milieu 42: 51-55.
- VÁZQUEZ, R., A. ÁLVAREZ, A. ARAGÓN, M. GARCÍA DE LARA, M.T. MAZORRA, M.C. RENDÓN, and M.L. GONZÁLEZ DE CANALES, 2003 Datos preliminares sobre inducción a puesta del lenguado *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) utilizando condiciones especiales de cautividad. En: Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura. 12-16 Mayo 2003. Cádiz, pp. 313-315.
- ZABALA, M., P. LOUISY, A. GARCIA-RUBIES, and V. GRACIA, 1997a Socio-behavioural context of reproduction in the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). Sci. Mar. 61: 79-89.
- ZABALA, M., A. GARCIA-RUBIES, P. LOUISY, and E. SALA, 1997b Spawning behaviour of the Mediterranean dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islands Marine Reserve (NW Mediterranean, Spain). Sci. Mar. 61: 65-77.

10

REPRODUCCIÓN DE PECES MARINOS Y DE AGUA DULCE EN LATINOAMÉRICA





REPRODUCCIÓN DE PECES MARINOS Y DE AGUA DULCE EN LATINOAMÉRICA

Vicente Gracia López¹
Iván Valdebenito Isler²

¹Centro de Investigaciones Biológicas
del Noroeste, S.C. (CIBNOR), México

²Escuela de Acuicultura. Facultad de Recursos
Naturales. Universidad Católica de Temuco, Chile

Resumen

La producción de peces marinos en Latinoamérica es escasa y ha sido fluctuante en los últimos años, y se basa en la producción de lisas (*Mugilidae*) en sistemas de cultivos semi-intensivos y pequeñas producciones de especies introducidas como *Dicentrarchus labrax* y *Sparus aurata* en República Dominicana, *Psetta maxima* en Chile y *Sciaenops ocellatus* en Ecuador. En el Noroeste mexicano se realiza el engorde de peces pelágicos como los jureles y atunes que sobrepasó las 600 toneladas en el año 2004. Si bien existe bastante información de investigación sobre la reproducción en numerosas especies de ocho familias de peces (Carangidae, Lutjanidae, Sciaenidae, Parali-chthyidae, Serranidae, Centropomidae, Galaxiidae y Tetraodontidae), ésta no se ha traducido todavía en producción industrial. Además de diferentes aspectos de la reproducción que deben resolverse, la primera alimentación larval, los requerimientos nutricionales en las diferentes tallas, el canibalismo y las enfermedades, siguen siendo



las principales dificultades para el cultivo exitoso de muchas de las especies investigadas.

En las especies de agua dulce existe una producción industrial de más de seiscientas mil toneladas anuales en el grupo de los salmónidos, basada en la aplicación de tecnologías en la reproducción que van desde la modificación de los periodos de puestas, uso de hormonas para sincronizar la maduración final de los ovocitos, hasta la criopreservación y transporte de gametos. Existe un grupo importante de especies nativas en fase experimental, pero que pronto se iniciará su producción industrial, como algunas especies de los géneros *Colossoma* y *Piaractus* cuya producción es incipiente en Brasil, Perú, Colombia y Venezuela.

Abstract

*The aquaculture production of marine fish in Latin America is reduced and has been fluctuating in the last years. Mulletts (Mugilidae) are produced annually in semi-intensive systems and there are small productions of introduced species like *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* in Dominican Republic, *Psetta maximun* in Chile and *Sciaenopus ocellatus* in Ecuador. In Mexico, the fattening of pelagic fish species as yellowtail and tuna exceeded the 600 tons during 2004. Although, there is enough research information on the reproduction in numerous species of eight fish families (Carangidae, Lutjanidae, Sciaenidae, Paralichthyidae, Serranidae, Centropomidae, Galaxiidae and Tetraodontidae), this has not been translated in industrial production yet. Besides different aspects related to reproduction that must be solved, first larval feeding, nutritional requirements during different stages, cannibalism and diseases, are still the main difficulties for the successful culture.*

*Freshwater species (salmonids) are produced at industrial level (600,000 tons per year) based on reproduction technologies which includes the modifications of the spawning periods, the employment of hormones to synchronize oocyte final maturation and cryopreservation of gamets. On the other hand, there is an important group of native species of the genus *Colossoma* and *Piaractus* still produced at pilot scale in Brazil, Peru, Colombia and Venezuela.*



10.1. REPRODUCCIÓN DE PECES MARINOS EN LATINOAMÉRICA

10.1.1. Introducción

Una ojeada a la producción actual de peces marinos en Latinoamérica (FAO, 2004) nos proporciona una visión de la realidad muy diferente a la de peces de agua dulce, crustáceos y moluscos. En el caso del cultivo de peces marinos, y teniendo en cuenta el periodo 1996-2004, la producción ha sido escasa y fluctuante. En primer lugar, se han citado valores de unas pocas decenas de toneladas anuales de lisas (*Mugilidae*) producidas solamente en dos países latinoamericanos, que generalmente hacen referencia a cultivos semi-intensivos y sin tener ninguna base científica ni de desarrollo tecnológico local sobre reproducción y producción de juveniles. Además, sólo se han citado pequeñas producciones de especies introducidas como la lubina *Dicentrarchus labrax*, la dorada *Sparus aurata* en República Dominicana y el rodaballo *Psetta maxima* en Chile. La tecnología de estas especies se desarrolló en Europa y Estados Unidos y no serán revisadas en este capítulo. Sin embargo, la corvina ocelada *Sciaenops ocellatus* que fue introducido en el Ecuador para su producción y extendido a otros países de Latinoamérica para poder ser potencialmente cultivado en ellos, será objeto de revisión en este capítulo. Para finalizar el cuadro sobre producción, tenemos el engorde de pelágicos como los jureles y atunes que sobrepasaba las 600 toneladas en el año 2004. Esta actividad que se realiza en el Noroeste mexicano ha ido en aumento paulatinamente en los últimos años. Este capítulo sobre la investigación de la reproducción de peces marinos en Latinoamérica, está dirigida hacia 8 familias: Carangidae, Lutjanidae, Sciaenidae, Paralichthyidae, Serranidae, Centropomidae, Galaxiidae y Tetraodontidae, siendo las cuatro primeras familias las más importantes en cuanto al número de especies estudiadas. El desarrollo tecnológico que permite la producción continua de juveniles está bien desarrollada para *Sciaenops ocellatus*, sin embargo, para el resto de especies todavía está en fase de estudio o en fase piloto. Existen avances significativos en la aplicación de hormonas para conseguir la puesta en numerosas especies, y se han conseguido desoves naturales de especies que han sido mantenidas y manejadas de acuerdo a sus características biológicas. Más allá de la reproducción, la primera alimentación larval, los requerimientos nutricionales



en las diferentes tallas, el canibalismo y las enfermedades siguen siendo los principales cuellos de botella para el cultivo exitoso de muchas de las especies investigadas. En síntesis, podemos asegurar que se ha realizado un gran esfuerzo en acondicionar y mantener reproductores en cautiverio con vistas a producir la mejor calidad y cantidad de huevos, aunque todavía falta la estandarización de métodos que permitan asegurar determinadas cantidades de huevos de calidad. De todas formas, parece que la fase de larva es la que más problemas tiene, y aunque se han realizado algunas pruebas larvales y de producción de juveniles en varias especies, éstas requieren de continuidad y repetición, así como investigaciones encaminadas a superar la baja supervivencia larval o/y el lento crecimiento de los juveniles.

10.1.2. *Carangidae* (jureles)

10.1.2.1. *Seriola dumerili* (medregal coronado)

En referencia al desove, éste ocurre cuando la temperatura se sitúa entre 22 y 25 °C (Kuronama y Fukusho, 1984). Esta especie desova espontáneamente desde abril hasta octubre, cuando los organismos son mantenidos por seis años en tanques de 500 m³ bajo condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura (Jerez *et al.*, 2006), aunque también ha sido reproducida exitosamente mediante inducciones hormonales de 550-1.000 UI kg⁻¹ GCH ó 50 µg kg⁻¹ LHRHa en hembras con ovocitos de un tamaño de 600 µm, el indicado para tener una respuesta positiva a la inducción hormonal. El periodo latente de respuesta varió de 46 - 60 h para GCH y 30 h para LHRHa, a una temperatura media del agua de 21 °C (García *et al.*, 2001). También, se han obtenido desoves al inducir hormonalmente con implantes cargados con GnRH_a a organismos mantenidos durante 6 años en cautiverio (Papandroulakis *et al.*, 2005). La edad de total madurez reportada para la especie según la proporción de ovocitos maduros en el ovario es de 5 años (Marino *et al.*, 1995), teniendo los huevos un diámetro medio de 1,1 mm (Masuma *et al.*, 1990). El cultivo larvario puede llevarse a cabo en tanques de 10.000 litros, la primera alimentación es en el tercer y cuarto día y se utiliza como alimento rotíferos, nauplius de artemia y mezcla de alimentos a una temperatura de cultivo de 23 °C. La metamorfosis ocurre entre los 31 y 36 días cuando la talla se sitúa entre 16 y 19 mm (Masuma *et al.*, 1990). La fertilización obtenida



ha sido del 61,75 %, y en el laboratorio se obtuvo el 16,75 % de supervivencia (Jerez *et al.*, 2006), aunque en cultivos de mesocosmos solo se ha logrado una supervivencia de 3,5 % (Papandroulakis *et al.*, 2005).

10.1.2.2. *Seriola lalandi* (madregal o jurel aleta amarilla)

En México, el jurel de aleta amarilla se captura de un tamaño de 2-3 kg para la engorda en jaulas flotantes en Bahía Magdalena, B.C.S. (Avilés-Quevedo, 2002). Se ha observado que el periodo de desove se encuentra entre la primavera y el verano (Poortenaar *et al.*, 2001) y que es un desovador múltiple a una temperatura entre 22 y 25 °C (Kuronama y Fukusho, 1984), donde los huevos tienen un tamaño promedio de 1,4 mm. Las larvas, cuya primera alimentación en el laboratorio se suministra a los tres días después de la eclosión, tienen un rápido crecimiento alcanzando una talla de 4,5 mm en el cuarto día. La metamorfosis ocurre aproximadamente a los 30 días, alcanzando una longitud de 15 mm (Fujita y Yogata, 1984).

10.1.2.3. *Seriola peruana* (madregal o jurel fortune)

En Ecuador es conocida como *Seriola mazatlana* (nombre incorrecto), donde se reproduce naturalmente de mayo a enero a una temperatura de 26 °C (Benetti, 1997). La fecundidad promedio es de 400.000 huevos por hembra, las larvas son alimentadas con rotíferos y artemia enriquecida con ácidos grasos altamente insaturados (HUFA) y los juveniles son engordados en jaulas flotantes (Benetti *et al.*, 1995). Este pez presenta canibalismo en las primeras etapas de vida y la supervivencia es muy variable ya que fluctúa entre el 1 y el 30 %. Entre las enfermedades más comunes detectadas en las larvas se encuentra la epiteliocystis (Benetti, 1997).

10.1.2.4. *Seriola rivoliana* (madregal limón, hojarán común, bojala o huayaípe)

En el Pacífico americano, esta especie se distribuye desde Los Estados Unidos hasta Perú (Eschmeyer *et al.*, 1983) y en el Atlántico, desde Estados Unidos hasta Argentina (Cervigón, 1993). En Ecuador, se han mantenido reproductores en piscinas de 0,05 hectáreas con 1 metro de profundidad o en piscinas de 18 m³ a temperatura ambiente,



salinidad de 35 ‰ o y fotoperiodo natural, llegando a desovar en cautiverio (Blacio *et al.*, 2002; Blacio, 2005). La incubación de los huevos se lleva a cabo en pequeños recipientes de 50 L donde ocurre también la eclosión, aproximadamente, un día después de la fertilización a altas temperaturas. Las larvas se cultivan en tanques de 500 L a 26,5 °C donde son alimentadas con rotíferos enriquecidos, nauplios de artemia y dieta seca, con una supervivencia del 35 ‰, observándose canibalismo a partir de la tercera semana. Los juveniles son alimentados tres veces al día con alimento comercial para trucha (Blacio *et al.*, 2002; Blacio, 2005).

10.1.3. *Centropomidae* (robalos)

Los robalos (Género *Centropomus*) son un grupo de peces muy apreciados por su carne y de alto valor comercial en gran parte de Latinoamérica. Dentro de este grupo de especies, existen numerosos trabajos, estudios e investigaciones, destacando los trabajos efectuados con las especies *Centropomus medius*, *C. parallelus* y *C. undecimalis*.

10.1.3.1. *Centropomus medius*

(robalo paleta o robalo aleta prieta)

Un amplio estudio sobre el robalo paleta *C. medius*, indica que es una especie que tiene un desarrollo ovárico sincrónico por grupo, con un periodo de desove desde septiembre hasta noviembre. La estrategia reproductiva es hermafrodita protándrica y los machos son más pequeños que las hembras. La fecundidad para una hembra de 0,89 kg es de un millón de huevos, aproximadamente (Maldonado, 2004; Maldonado *et al.*, 2005). En cautiverio, se han mantenido sin madurar el primer año, aunque hembras maduras capturadas en el medio natural, tuvieron una respuesta positiva al desove tras la inducción hormonal con dos inyecciones de GCH (1.000 y 500 UI kg⁻¹) separadas por 24 h (Gracia-López, com. Pers.).

10.1.3.2. *Centropomus parallelus*

(robalo graso o chucumite).

En Brasil, el robalo graso *C. parallelus*, ha sido objeto de muchos trabajos y ha sido reproducido artificialmente mediante la aplicación de 50 µg kg⁻¹ de LHRHa, y los huevos fertilizados (82,7 ‰) fueron intro-



ducidos en tanques de 1.800 L en una densidad media de 31,3 huevos L⁻¹ (Álvarez-Lajonchere *et al.*, 2002a; Álvarez-Lajonchere *et al.*, 2002b, Álvarez-Lajonchere *et al.*, 2004) donde se obtiene un porcentaje de eclosión del 93 %. También se han realizado numerosas inducciones con GCH, respondiendo al desove un número elevado de hembras, con la observación de que la fecundidad es creciente cuanto más tiempo de cautiverio tienen los organismos (Cerqueira, 2002).

Las larvas pueden alimentarse con rotíferos (*Brachionus rotundiformis*) y más adelante con meta-nauplios de *Artemia*, continuando el destete con una dieta seca, consiguiendo que la mortalidad durante este proceso sea menor al 4 %. Entre los trabajos más relevantes se encuentran los de Álvarez-Lajonchere *et al.*, (2002b y 2004), sobre destete de larvas el de Alves *et al.*, (2006) y sobre alimentación larval (Temple *et al.*, 2004).

10.1.3.3. *Centropomus undecimalis* (robalo común o blanco)

El robalo común, *C. undecimalis* es un pez marino carnívoro importante para la industria pesquera comercial y recreativa en el Golfo de México. La disminución de las poblaciones naturales en muchas áreas y el potencial económico que existe en el desarrollo de tecnologías para cultivar el robalo y para repoblar áreas naturales ha incrementado el interés por este grupo de especies (Taylor *et al.*, 1998). Se han realizado investigaciones extensas en diversos laboratorios sobre desoves inducidos con GCH y LHRHa (Ager *et al.*, 1978; Roberts, 1987; Tucker, 1987; Cerqueira, 2002), cría larval (Edwards y Henderson, 1987; Cerqueira, 2002), producción de juveniles (Edwards y Henderson, 1987; Maciorowski *et al.*, 1987; Tucker, 1987; Cerqueira, 2002), nutrición y técnicas de destete (Cerqueira, 2002; Gracia-López *et al.*, 2003), consumo de oxígeno (Peterson y Gilmore, 1991; Gracia-López *et al.*, 2006) y procesos osmorreguladores (Pérez-Pinzón y Lutz, 1991). Asimismo, la biología de la reproducción enfocada hacia los procesos ováricos y testiculares y los ritmos de desove ha sido estudiada por Grier y Taylor, 1998; Taylor *et al.*, 1998; Grier, 2000. *C. undecimalis* tiene un desarrollo ovárico sincrónico por grupo (Peters *et al.*, 1998) y la especie es considerada hermafrodita protándrica (Taylor *et al.*, 2000).



10.1.4. Galaxiidae

10.1.4.1. *Galaxias maculatus* (puye o inanga)

El puye es un pez catádromo marginal de interesante valor en el mercado internacional, debido a que es considerado un símil comercial de la angula. En Chile se ha desarrollado una tecnología de cultivo que se encuentra en fase experimental con el cultivo de reproductores en estanques de tierra, desove e incubación artificial y larvicultura en sistemas extensivos (Barile *et al.*, 2003). Valdebenito (2003) realiza una descripción del ciclo de vida de la especie en condiciones de cultivo experimental, así como el manejo artificial de la reproducción y la caracterización de los gametos masculinos y femeninos. Dantagnan *et al.*, (2002) describe una metodología de producción de larvas en un sistema recirculado y Rodríguez y Domke (2006) caracterizan el proceso de alimentación en condiciones de cautiverio y en ambiente natural para la etapa de larva temprana. Dantagnan *et al.*, (2007) realiza un estudio comparativo de la composición de ácidos grasos en huevos, embriones y larvas provenientes de especímenes silvestres (de agua dulce y diadromicos) y de cultivo.

10.1.5. *Lutjanidae* (pargos o huachinangos)

10.1.5.1. *Lutjanus analis* (pargo criollo)

La inducción al desove ha sido lograda mediante la aplicación de la hormona GCH, con una dosis de 1.000 UI Kg⁻¹ y la larvicultura se realiza en una densidad de 10,5 larvas L⁻¹, con una supervivencia de 14,3 % (Clarke *et al.*, 1997). Los huevos tienen un diámetro de 0,8 mm. También se han cultivado exitosamente larvas de pargo criollo mediante el uso de «agua verde» a una temperatura de 28 °C, ocurriendo la metamorfosis entre los 30 y 38 días, cuando los organismos tienen un tamaño de 29 mm (Watanabe *et al.*, 1998). Se calcula que la fecundidad por hembra es de 1.365.975 huevos (Bortone y Williams, 1986). En el Caribe colombiano se ha empleado el control del fotoperiodo y de la temperatura para obtener la maduración gonadal, con resultados positivos en desoves y obtención de larvas (Juan Felipe Sierra, comentario personal).



10.1.5.2. *Lutjanus argentiventris* (pargo amarillo)

En México, se han obtenido desoves naturales de organismos mantenidos en cautiverio mediante la manipulación del fotoperiodo y la temperatura (Martínez-Lagos, 2003). El tamaño de los huevos es de 0,8 mm y se han logrado en el laboratorio individuos de 2,2 mm (Avíles-Quevedo *et al.*, 1998).

10.1.5.3. *Lutjanus campechanus* (pargo colorado o huachinango del Golfo)

Esta especie es un desovador múltiple y la fecundidad en una hembra de 754 mm fue de 9.300.000 huevos (Moran, 1988). Se ha realizado la inducción al desove utilizando una inyección de GCH (1.000 IU kg^{-1}) en donde las hembras respondieron entre 24 y 30 horas, y los huevos se obtuvieron mediante masaje abdominal, obteniendo una media de 150.000 huevos (0,8 mm) por desove (Laidlei y Ostrowski, 2001). También se han registrado desoves espontáneos de organismos mantenidos en condiciones de cautiverio (Hearn, 1996). La calidad de los huevos (e.i. % fertilización, % de supervivencia, tamaño del huevo y tamaño de la gota de aceite) de los desoves espontáneos es mejor que la obtenida por medio de inducción hormonal (Papanikos *et al.*, 2001). El cultivo larval se realiza a 24°C y la longitud larval en la metamorfosis es de 2,2 mm (Collins *et al.*, 1980; Rabalais *et al.*, 1980) aunque también se ha realizado cultivo larvario con «agua verde» (Hearn, 1996).

10.1.5.4. *Lutjanus griseus* (pargo mulato o caballere)

En Venezuela se han logrado avances significativos en el cultivo de *L. griseus* (Cabrera *et al.*, 1997a, 1999, 2000a y 2000b). Las hembras pueden desovar varias veces en la misma época reproductiva y se pueden llegar a obtener 590.000 huevos por hembra de 325 mm (Bortone y Willians, 1986). Se han logrado desoves mediante la aplicación de GCH en una inyección desde 1.000 a 6.300 UI kg^{-1} , produciéndose huevos con un diámetro medio de 0,7 mm. (Cabrera *et al.*, 1997b). También se han obtenido desoves mediante la aplicación de $30 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de GnRH α , obteniendo huevos de 0,8 mm (Cabrera *et al.*, 1997b; Rosas *et al.*, 1998). Las larvas alcanzan un tamaño de 2,3 mm y la primera



alimentación se observa entre el día 3 y 4. La apertura de los ojos es a partir del día 4 (Cabrera *et al.*, 1997b, Rosas *et al.*, 1998). La salinidad apropiada para los juveniles es de 1 a 35 ‰ (Bortone y Williams, 1986). Los trabajos realizados en Venezuela reportan que el periodo de desoves de la especie se encuentra entre los meses de junio y agosto, a una temperatura alrededor de los 28 °C y que los organismos de 0,25 kg pueden estar sexualmente maduros. La talla de los reproductores va desde 0,25 hasta 1,5 kg, con una proporción de sexos macho-hembra de 2:1. La técnica de agua verde es utilizada en el cultivo larvario, con las microalgas *Tetraselmis chuii*, *Chlorella* sp., *Chaetoceros gracilis* y *Nannochloropsis* sp. El alimento vivo utilizado fue larva trocofora de ostra, rotíferos, copépodos, mysidáceos, nauplios y artemia adulta, y se ha llegado a conseguir una supervivencia del 1% (Cabrera *et al.*, com. pers.).

10.1.5.5. *Lutjanus synagris* (pargo biajaiba)

En Venezuela se han logrado avances significativos en el cultivo de *L. synagris* (Cabrera *et al.*, 1997a, 1999, 2000a y 2000b). En la Universidad de Miami se ha logrado el desove inducido hormonalmente con GCH (500 UI Kg⁻¹), obteniendo huevos de 0,7 mm y donde las larvas fueron alimentadas a base de rotíferos, zooplankton y artemia (Clarke *et al.*, 1997). Los juveniles se cultivan a una temperatura entre 15 y 29 °C, con un rango de salinidad entre 19 y 35 ‰ (Bortone y Williams, 1986). Cabe resaltar los trabajos realizados en la Universidad de Nueva Esparta en Venezuela, en los cuales se reporta la maduración y desoves de hembras de 0,35 kg y machos de 0,3 kg en tanques de 1 m³ y una proporción 2:1 machos: hembras, a una temperatura de 29 °C y salinidad de 37 ‰. Los organismos se inducen al desove utilizando GCH (500 UI kg⁻¹ en hembras y 250 UI kg⁻¹ en machos), obteniendo desoves 30 h después de la inyección. La técnica de agua verde es la utilizada en el cultivo larvario, con las microalgas *Isochrysis galbana* y *Chaetoceros ceratosporum*, utilizando como alimento vivo rotíferos y Artemia. Las larvas se cultivan a una densidad de 30 organismos por litro y la supervivencia obtenida fue del 6,5 % después de 15 días (Cabrera, com. pers.).



10.1.5.6. *Lutjanus peru* (huachinango del Pacífico)

Se reporta la inducción hormonal de organismos silvestres utilizando dos dosis de GCH (500 UI kg^{-1} y 24 horas más tarde 1.000 UI kg^{-1}) a una temperatura de 25°C , el desove se obtuvo 28 horas después de la primera inyección (Dumas *et al.*, 2004). Se han observado organismos maduros en cautiverio mantenidos en un sistema de recirculación con agua entre 18 y 23°C a excepción de dos meses entre marzo y mayo, donde la temperatura descendió a 17°C . Estos organismos fueron inducidos con GCH en la misma dosis y los huevos fueron obtenidos mediante masaje abdominal de 72 a 85 h después de la primera inyección. La alimentación consiste en alimento fresco, adicionando una premezcla de vitaminas (Dumas *et al.*, 2001). La época de desove es de marzo a noviembre, con un pico en el mes de agosto. La primera madurez se observó en hembras de 295 mm de longitud a la horquilla (Santamaría-Miranda *et al.*, 2003).

10.1.5.7. *Ocyurus chrysurus* (rubia)

En la Universidad de Miami, esta especie ha sido inducida al desove mediante la aplicación de GCH (500 UI kg^{-1}) obteniendo huevos con un tamaño medio de 0,93 mm (Clarke *et al.*, 1997). En la Universidad de Austin Texas, reportan el cultivo larval a 27°C , alcanzando en 62 días una longitud de 20 mm (Riley *et al.*, 1995).

10.1.6. *Paralichthyidae* (lenguados)

10.1.6.1. *Etropus ectenes* (lenguado zapato)

En Perú, se mantuvieron reproductores en tanques de fibra de vidrio de 300 L, aunque no hay reportes de que éstos se reprodujeran en cautiverio (Chinchayán *et al.*, 1997).

10.1.6.2. *Paralichthys adspersus* (lenguado fino)

Se distribuye desde Paita, Perú hasta Lota e Islas Juan Fernández, en Chile. Son peces desovadores parciales asincrónicos y se reproducen naturalmente desde septiembre hasta junio (Ángeles y Mendo, 2005). Esta especie ha sido trabajada en Ecuador donde se han obtenido desoves naturales que se han mantenido en tanques de



1,5 m de diámetro en una densidad de 1.500 huevos tanque⁻¹. Se ha logrado un 70 % de supervivencia hasta la talla comercial, aunque la supervivencia larval es menor (3-8 %) (Benetti *et al.*, 1995). Entre los trabajos más relevantes se pueden señalar los realizados en la Universidad Católica del Norte, en Chile, donde se ha estudiado la viabilidad del cultivo del lenguado (Silva y Velez, 1998; Silva, 2001), el efecto de las microalgas en el cultivo larval (Silva, 1999), la evaluación del crecimiento de juveniles en estanques (Silva *et al.*, 2001) y el crecimiento, fecundidad y diferenciación sexual (Ángeles y Mendo, 2005).

10.1.6.3. *Paralichthys californicus* (lenguado de California)

Esta especie se distribuye desde el estado de Washington, EEUU, hasta el estado de Baja California Sur, México y el periodo reproductivo abarca desde febrero hasta el mes de agosto (Cervantes-Trujano *et al.*, 2002). Los reproductores son capturados con señuelos, redes agalleras y línea con anzuelo (MacNair *et al.*, 2001). Se ha logrado la inducción hormonal con LHRHa en una dosis de 50 µg Kg⁻¹ obteniendo huevos mediante masaje abdominal (315.000 hasta 589.000), aunque con bajas tasas de fertilización (8 - 64%) (Caddell *et al.*, 1990). Más recientemente, se han observado desoves con una supervivencia del 60 - 90 % (Cervantes-Trujano *et al.*, 2002). En 2006 en el CICESE (Ensenada, México) se produjeron 40.000 ejemplares los cuales han sido utilizados como semilla en granjas piscícolas (Lazo, 2006 pers com). Los sistemas de incubación son tanques cilindrocónicos de 200 L, en los cuales se introduce una densidad de 13 larvas L⁻¹ y se mantienen a 18 °C, una salinidad de 33 ‰ y la concentración de oxígeno disuelto de 6,4 mg ml⁻¹. La alimentación larval consiste en rotíferos *Brachionus plicatilis* y nauplios de *Artemia* sp. enriquecidos con HUFA (Zacarias-Soto *et al.*, 2006). Dentro de los trabajos más relevantes podemos encontrar la inducción al desove con LHRHa (Caddell *et al.*, 1990) el desarrollo morfológico y crecimiento alométrico de larvas (Gisbert *et al.*, 2002) el de desarrollo ontogénico del sistema digestivo (Gisbert *et al.*, 2004a), los efectos del alimento en la condición nutricional y la mortalidad de larvas (Gisbert *et al.*, 2004b) y la actividad proteolítica en larvas (Zacarias-Soto *et al.*, 2006).



10.1.6.4. *Paralichthys microps* (lenguado de ojo chico)

En Chile, los reproductores fueron mantenidos en estanques de 1 m³ con recirculación permanente del agua, en condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura y alimentados con pescado fresco. La inducción al desove se realizó inyectando intramuscularmente GCH (500 UI Kg⁻¹ las hembras y 100 - 200 UI Kg⁻¹ los machos) obteniendo desoves voluntarios de huevos con un diámetro promedio de 0,8 mm. El periodo de desove se prolongó entre 78 y 92 días, obteniendo entre 900.000 y 1,1 millones de huevos, aproximadamente (Silva, 1990). También se han obtenido desoves naturales de reproductores mantenidos en cautiverio durante 2 años, en tanques de 1 m³ bajo condiciones naturales de fotoperiodo y temperatura (13,3-19,7 °C) y una salinidad de 34,3-34,6 ‰. Se consiguieron entre 7 y 10,7 millones de huevos por año (Silva, 1996).

10.1.6.5. *Paralichthys orbignyanus*

Se encuentra en Brasil, Uruguay y Argentina y posee la característica de ser eurihalina (Sampaio y Bianchini, 2002). Es una de las especies de mayor valor comercial en el sur de Brasil, país donde se han realizado diversas investigaciones. La primera inducción al desove se realizó con GCH (300 - 400 UI Kg⁻¹) y los huevos fueron obtenidos mediante masaje abdominal y posteriormente fecundados, obteniendo una fecundidad entre 224.000 y 280.000 huevos Kg⁻¹ de hembra y una producción de larvas de 40.500 y 83.200 larvas kg⁻¹ de hembra, respectivamente (Cerqueira *et al.*, 1997). Como datos importantes, cabe destacar que se obtuvo una tasa de fertilización del 90 % y el tiempo de incubación fue de 42 - 53 h, el diámetro medio de los huevos de 0,8 mm y la longitud promedio de una larva eclosionada fue de 2 mm (Cerqueira *et al.*, 1997). También se ha inducido al desove con GCH (500 - 1000 UI Kg⁻¹ a hembras y 250-500 UI Kg⁻¹ los machos) (Cerqueira, 2005). Este autor también aporta algunos datos sobre cultivo larval. Los juveniles con un peso de 0,2 kg son mantenidos en tanques de 1.000 L con una salinidad de 33 ‰ y un recambio de agua de 50 % (Sampaio y Bianchini, 2002). Se ha observado en los reproductores, la infección de *Amyloodinium ocellatum* y el tratamiento utilizado fue sulfato de cobre (1,5 ‰ durante 24 h por 5 días), recomendando la limpieza de los



tanques con cloro para eliminar el parásito (Abreu *et al.*, 2003). Dentro de los trabajos más relevantes se encuentran los relacionados con el efecto de la salinidad en la osmorregulación, el crecimiento (Sampaio y Bianchini, 2002) y el desarrollo embrionario (Cerqueira, 2005).

10.1.6.6. *Paralichthys woolmani* (lenguado huarache)

Benetti (1997) reporta un estudio en Ecuador, donde se han obtenido desoves inducidos con modificaciones del fotoperiodo y la temperatura en peces mantenidos en cautiverio en tanques de 50 m³. Se obtuvo una fecundidad promedio de 220.000 huevos, los cuales fueron incubados en tanques de 1.000 L y posteriormente las larvas fueron transferidas a estanques de 15 m³ rectangulares y mantenidos a una temperatura de 20 °C, con recambio de agua de 30-100 % consiguiendo una supervivencia entre el 50 y 70 %. Los reproductores son alimentados con pescado fresco (Clupeidae y Scombridae) y eventualmente calamar y se les da un suplemento de vitaminas y minerales 3 veces por semana. La alimentación larval consiste en rotífero y artemia cultivados y copépodos colectados, y en el destete se utiliza alimento comercial. Los reproductores son tratados en contra de enfermedades parasitarias con baños de dos minutos de agua dulce, seguidos por 50 ppm de formalina durante tres minutos y tratamiento con oxitetraciclina para controlar las infecciones bacterianas durante 5-8 días. Las larvas han presentado enteritis bacteriana y también hipomelanosis (Benetti, 1995; Benetti, 1997).

10.1.7. *Sciaenidae* (corvinas)

10.1.7.1 *Atractoscion nobilis* (corvina cabaicucho)

En los Estados Unidos de Norteamérica se ha estudiado esta especie cuyas hembras maduran después de 4-5 años, con un peso mayor de 40 kg. La fecundidad es de 0,5 a 1,5 millones de huevos por desove con intervalos de 10-14 días entre desoves (Drawbridge, 2001). El huevo mide 1,3 mm y a una temperatura de cultivo de 16 °C, la larva mide 2,7 mm, la primera alimentación se proporciona a los 4,8 días, la formación de los ojos se produce a los 5-6 días, y a los 42-53 días se da la metamorfosis con una longitud de 16-20 mm (Moser *et al.*,



1983; Orhum, 1989). La temperatura óptima del desove es de 15 a 17 °C y la mejor temperatura para las larvas es de 17-23 °C y de 23 °C para los juveniles (Orhum, 1989). En el cultivo larvario de la especie se reporta una densidad de siembra de 16,7 individuos L⁻¹, y a los 21 días la supervivencia es del 60 % (Orhum, 1989). Los organismos alcanzan 1 kg de peso en 17 meses de engorda (Drawbridge, 2001).

10.1.7.2. *Cynoscion nebulosus* (corvina pinta)

Esta especie se distribuye en la costa Atlántica del Oeste, en su parte Norte y en todo el Golfo de México. La especie puede desovar de forma espontánea, por inducción hormonal y masaje abdominal o por ovulación natural y masaje abdominal (Tucker, 1998). Una hembra de 1,4 kg con ovulación natural, puede desovar seis veces en la misma época de puesta y puede producir más de 670.000 huevos (Tucker y Faulkner, 1987). Se ha logrado la inducción hormonal al desove con GCH (100 UI Kg⁻¹) a una temperatura de 26 - 28 °C, donde el tiempo de ovulación fue de 26 - 32 h (Colura, 1974; Arnold, *et al.*, 1976), con 100 µg GnRHa Kg⁻¹, a una temperatura de 27 °C, donde el tiempo de ovulación fue de 30 a 35 h (Thomas y Boyd, 1989) y con 2 inyecciones de GCH (200 UI Kg⁻¹) a una temperatura de 23-25 °C, con la ovulación antes de las 48 h (Szedlmayer, 1987). El tamaño del huevo es de 0,8 mm y la larva eclosionada mide 1,5 mm, la primera alimentación se proporciona a los dos días, y a los 37 días se alcanza la metamorfosis cuando el individuo mide 38 mm (Fable *et al.*, 1978; Johnson, 1978; Thresher, 1984; Tucker, 1988). Se han estudiado las temperaturas y salinidades óptimas para el desove, cultivo larval y cultivo de juveniles (Wakeman y Wohlschlag, 1977; Taniguchi, 1981; Mercer, 1984; Tucker y Faulkner, 1987; Banks *et al.*, 1991; Lankford y Targett, 1994). Se recomienda para el cultivo larvario de la especie una concentración de nitritos menor de 10 mg L⁻¹, considerándose nocivo o letal de 100 - 500 mg L⁻¹ (Holt y Arnold, 1983; Holt, 1990).

La densidad del cultivo larvario es de 5 individuos L⁻¹, y la alimentación es con rotíferos y artemia llegando a obtener en 30 días una supervivencia del 30 % (Arnold *et al.*, 1976; Fable *et al.*, 1978).

El uso de probióticos incrementa significativamente la supervivencia y el peso de los organismos (Rottman *et al.*, 2005).



10.1.7.3. *Cynoscion xanthulus*

(corvina de boca amarilla o boquinaranja)

Se ha realizado la inducción al desove por medio de hormonas GCH (50 UI kg^{-1}), siendo el tiempo de ovulación de 26-32 h (Bumguardner *et al.*, 1992). La época de puesta es de abril a septiembre y la temperatura tiene un rango de 25-30 °C (Prentice *et al.*, 1989). Utilizando una mezcla de zooplancton como alimento se han obtenido supervivencias muy buenas entre el 96-100 % (Bumguardner *et al.*, 1992).

10.1.7.4. *Micropogonias undulatus*

(corvina gurrubata o roncadiná)

Esta especie se ha trabajado en Estados Unidos, obteniendo avances significativos en el cultivo. Se ha logrado la inducción al desove mediante el uso de GCH en tres inyecciones de 500 UI kg^{-1} a 19-24 °C, obteniendo huevos de 0,7 mm después de 6-7 h y alcanzan una longitud en el laboratorio de 1,6 mm, siendo el día 35 cuando ocurre la metamorfosis (Middaugh y Yoakum, 1974). También se ha realizado la inducción utilizando una dosis de $100 \mu\text{g GnRHa kg}^{-1}$ (Gwo *et al.*, 1991). El rango de salinidad para los juveniles es de 0-70 ‰ y la temperatura de 0-36 °C (Díaz y Onuf, 1985). Trabajos realizados en la Universidad de Austin Texas reportan que la especie alcanza los 21 gramos en 127 días (Davis y Arnold, 1997)

10.1.7.5. *Pogonias cromis*

(corvina negra o tambor negro)

La época de desove de esta especie se prolonga desde enero a mayo (Nieland y Wilson, 1993; Saucier y Baltz, 1993), siendo el número de desoves en un año de 25 a 33, con una fecundidad de 1.360.000 huevos por hembra de 8,8 kg (Nieland y Wilson, 1993). La inducción hormonal se ha realizado con 5,5 de mg homogenizado de pituitaria de carpa kg^{-1} a 21 °C, con un tiempo de ovulación de 42 a 43 h (Garza *et al.*, 1978) y también utilizando GCH (275 UI kg^{-1}) (Henderson-Arazapalo *et al.*, 1994). La temperatura de cultivo es de 15-26 °C, y la supervivencia reportada después de 39 - 43 días es del 100 %. La especie alcanza un peso de 144 g en 27 semanas, con una supervivencia del 94 % (Henderson-Arazapalo *et al.*, 1994).



10.1.7.6. *Sciaenops ocellatus* (corvina ocelada)

Esta especie es desovador múltiple y la fecundidad calculada para una hembra de aproximadamente 11 kg, puede estar entre 636.000 huevos (Colura *et al.*, 1991) y 4.450.000 (Henderson-Arzapalo, 1995). La inducción de esta especie se ha logrado utilizando GCH (500 - 600 UI kg⁻¹) y se consiguieron huevos de 0,95 mm (Colura, 1990; Colura *et al.*, 1991). También se logró inducir utilizando una inyección con 100µg GnRHa kg⁻¹ (Thomas y Boyd, 1988). A una temperatura de 25 °C, en el primer día se alcanzan 1,7 mm, la primera alimentación es a los 3 días, la formación de los ojos a los 5 y la metamorfosis a los 35 días cuando los organismos miden 25 mm (Henderson-Arzapalo, 1990; Holt *et al.*, 1990; Colura *et al.*, 1991). La temperatura óptima de desove es de 23-29 °C, para el cultivo larval 27 °C (22-30 °C), y para los juveniles cambia con el crecimiento (Henderson-Arzapalo, 1990; Holt *et al.*, 1990; Neill, 1990; Roberts, 1990; Colura *et al.*, 1991; Procarione y King, 1993; Whitehurst y Robinette, 1994). La salinidad fluctúa si se trata del desove, larvicultivo o juveniles, estos últimos son más resistentes a bajas salinidades. (Henderson-Arzapalo, 1990; Holt *et al.*, 1990; Neill, 1990; Colura *et al.*, 1991). El efecto de la salinidad, el amonio y los nitritos se han estudiado en las diferentes fases de vida (Holt y Arnold, 1983; Wise *et al.*, 1989; Henderson-Arzapalo, 1990; Holt, 1990; Neill, 1990; Colura *et al.*, 1991). Esta especie se comercializa normalmente a los dos años de edad y alcanza un peso de 1,4-1,8 kg; en Florida, a una temperatura de 15-32 °C, el cultivo es de 16 meses (Tucker *et al.*, 1997).

10.1.8. *Serranidae* (Cabrillas)

Epinephelinae (meros)

10.1.8.1. *Mycteroperca rosacea* (cabrilla sardinera)

Es una especie endémica del Noroeste mexicano. En el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) de México, se realizan investigaciones para desarrollar el cultivo de esta especie. En un principio, se reprodujeron organismos silvestres inducidos hormonalmente al desove con GCH (1.000 y 500 UI Kg⁻¹), con la aplicación de masaje abdominal y fertilización en seco (Kiewek-Martínez, 2004; Gracia-



López *et al.*, 2004a; Gracia-López *et al.*, 2004b). Los reproductores son anestesiados (Fig. 1) y canulados (Fig. 2) para conocer la madurez gonadal y el sexo de los ejemplares.

FIGURA 1.

Los reproductores son anestesiados antes de la manipulación para actividades como la determinación de la madurez gonadal o la inducción hormonal, entre otras.

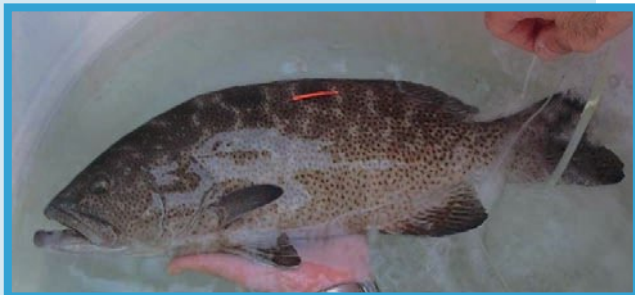


FIGURA 2.

Los organismos reproductores son canulados para obtener biopsias de la gónada, con una cánula de material plástico.



Este método permitió la obtención de huevos, aunque el estrés de los reproductores provocado por la captura, transporte y manejo influyó en la tasa de fecundación (Kiewek-Martínez, 2004; Gracia-López com. pers.). Una vez los reproductores se mantuvieron en cautiverio por más de un año, se observó que más del 80 % de los individuos maduraron (Kiewek-Martínez, 2004) y era viable realizar la inducción hormonal con GCH y LHRHa (Fig. 3) (Kiewek-Martínez y Gracia-López, 2004).

La aplicación de la GCH durante la época reproductora ha dado buenos resultados de fecundidad por desove (162.000 huevos Kg⁻¹) y



fecundación (66 %), obteniendo varios desoves de hembras inducidas mas de una vez durante la misma época de puesta (Fig. 4).

En cuanto a la inducción al desove con LHRHa los resultados no fueron los esperados en una primera prueba efectuada en el año 2003 (Kiewek-Martínez, 2004; Kiewek-Martínez y Gracia-



FIGURA 3.

Inducción hormonal a la puesta, aplicando la jeringa en la región intraperitoneal, usando como hormona la LHRHa.



FIGURA 4.

Desoves de hembras inducidas con la técnica del masaje abdominal.

López, 2004) y tampoco en la realizada con diferentes dosis de esta hormona en el año 2006 (Kiewek y Gracia-López, datos no publicados). Se ha estudiado la relación de la madurez sexual con los niveles de esteroides sexuales contenidos en sangre (Fig. 5) (Kiewek-Martínez *et al.*, 2006) y en el año 2006 se obtuvieron desoves naturales (Fig. 6) de organismos mantenidos en cautiverio entre 1 y 2 años con tasas de fertilización del 100 % (Gracia-López *et al.*, 2006b).



FIGURA 5.
Para diversos estudios es necesario extraer sangre, la cual puede obtenerse de diferentes partes del pez.



Los reproductores se capturan con anzuelos, señuelos, carnada viva o muerta y posteriormente se transportan al laboratorio en tanques de 750 y 1.000 L, con oxígeno suplementario, en trayectos de aproximadamente 5 h. Éstos permanecen en «cuarentena» que consiste en la aplicación de antibiótico y una serie de baños de agua dulce para eliminar los ectoparásitos. Los lotes de reproductores están conformados por 10 a 25 organismos en cada tanque de 8 a 15 m³. Se emplean sistemas de flujo abierto de agua. El tamaño de los huevos se encuentra entre 0,75 y 0,94 mm. La eclosión tuvo lugar entre 24 y 36 horas tras la fecundación de los huevos. La supervivencia larval en el día 12, fue del 2,66 %. La alimentación se compuso de trocóforas de almeja, rotíferos filtrados < 60 µm, rotíferos sin filtrar, nauplios

FIGURA 6.
Obtención de huevos procedentes de desoves naturales.





de artemia, metanauplios de artemia, microparticulados y alimento balanceado del día 47 al día 150 (Gracia-López *et al.*, 2005). Los peces fueron pesados a los cinco meses (30,8 g). Los resultados más relevantes hasta la fecha son , 21 millones de huevos fecundados y la producción de 18.000 juveniles. Actualmente, se mantienen lotes de organismos de los años 2004, 2005 y 2006. Las nuevas áreas de investigación son el desarrollo de vacunas genéticas e inmunoestimulantes y el uso de levaduras vivas como probióticos potenciales (Reyes, com. pers.). Se realizan estudios de enzimología y ya se ha descrito el desarrollo del sistema digestivo de la cabrilla sardinera (Lopez *et al.*, 2005).

10.1.8.2. *Paralabrax maculatofasciatus* (cabrilla arenera o de roca)

Se produce de manera experimental en Centros de Investigación en México. Esta especie tolera un amplio rango de temperatura (7,5-32 °C) pero en los valores extremos de este rango deja de alimentarse (Thomson *et al.*, 1987). Es eurihalina, pudiendo encontrarse en salinidades de 0 a 75 ‰ (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995) y es resistente al manejo, lo que facilita su captura y traslado. Presenta un prolongado periodo de desove de enero a junio con un pico en los meses de marzo y abril (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995), cuya maduración sexual precoz se sitúa a partir de los 6 cm de longitud (Avilés Quevedo *et al.*, 1996a ; Avilés Quevedo *et al.*, 2005). En condiciones de cautiverio, madura con el calentamiento del agua (20 a 24 °C), pero cuando la temperatura llega a más de 27 °C la actividad reproductiva entra en fase de reposo. En condiciones de control de temperatura (21- 23 °C) y fotoperiodo de 13:11 (luz-oscuridad) es posible obtener desoves continuos (Rosales-Velázquez *et al.*, 1992). Utilizando un sistema abierto y sin control de temperatura y fotoperiodo, el desove puede prolongarse hasta once meses, inhibiéndose con temperaturas superiores a 29,5 °C (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995). Las condiciones de cautiverio en jaulas flotantes no afectan el desarrollo reproductivo de la especie sino todo lo contrario, ya que en esas condiciones desova espontáneamente. Los reproductores se mantienen en jaulas flotantes (5 x 5 x 3m) y cuando éstos maduran, son transferidos a los tanques de desove de 24 m³. Alternativamente, se han probado hor-



monas como la GCH en dos dosis de 3000 UI kg⁻¹ (Pérez-Mellado, 1993) GnRHa en una dosis de 50 µg kg⁻¹ (Oda *et al.*, 1993) y diferentes dosis de LHRHa (Alcántar-Vázquez *et al.*, 2003) para estimular el desove. Los reproductores son alimentados con cabeza de calamar, lisa, sardina, macarela y camarón, así como con una dieta semi-húmeda (Avilés-Quevedo *et al.*, 1995; Avilés-Quevedo *et al.*, 1996b). La fecundidad media parcial es de 10.300 ± 3.090 huevos por desove, llegando a 800.000 huevos hembra⁻¹ por época reproductora. Los huevos fertilizados tienen un tamaño de 0,7 a 0,9 mm y la gota de aceite es de 0,1 a 0,2 mm dependiendo de la dieta de los reproductores. La incubación se efectúa a 22-23 °C y fuera de estas temperaturas la tasa de eclosión disminuye notablemente. El tiempo de incubación es de 25 a 13 h en un rango de temperatura de 18 a 30 °C. Temperaturas menores de 17 °C y superiores a 30 °C disminuyen la tasa de eclosión a menos del 50 % y las larvas no son viables.

10.1.9. Tetradontidae (botetes)

10.1.9.1. *Sphoeroides annulatus* (botete diana)

Se distribuye desde San Diego, EEUU, a lo largo del Pacífico hasta Perú y también en el Golfo de California (García-Ortega *et al.*, 2003). El tipo de ovario es sincrónico y se reproduce naturalmente de abril a junio (Duncan *et al.*, 2003). Los reproductores son mantenidos en tanques de 2.600 y 5.700 L con 400 % de recambio de agua al día, a una temperatura entre 25 y 29 °C y salinidad de 34 a 36 ‰. Son alimentados con calamar fresco y pienso comercial (Duncan *et al.*, 2003; Komar *et al.*, 2004). También se ha estudiado el efecto del fotoperiodo (14h luz y 10h oscuridad) y la temperatura a 23 °C (Komar *et al.*, 2004). El botete diana no ha desovado naturalmente en los tanques (Duncan *et al.*, 2003; García-Gasca *et al.*, 2006) por lo que se han inducido con LHRHa, primero con inyecciones en dosis de 20-160 µg kg⁻¹ obteniendo una fecundidad de 614.000 a 1.624.000 huevos, con una tasa de fertilización de 93-100 % (Duncan *et al.*, 2003) y en dos inyecciones de 20 y 40 µg kg⁻¹ donde se obtienen huevos mediante masaje abdominal entre 12 y 24 horas después de la primera inyección con una tasa de fertilización de 91-93% (Komar *et al.*, 2004), donde la eclosión ocurre 75 horas después de la fertilización (García-Gasca *et al.*, 2006). También se han probado los im-



plantas EVAc cargados con LHRHa (Duncan *et al.*, 2003). Los huevos son adheridos a hojas de vidrio e introducidos en tanques de 600 L a una temperatura de 20 °C para la incubación (García-Gasca *et al.*, 2006) y mantenidos con 12 horas de luz y 12 de oscuridad (Komar *et al.*, 2004). Las larvas son alimentadas con una mezcla de microalgas (*Nanochloropsis* sp, *Isochrysis* sp) y rotífero (*B. rotundiformis*), nauplios de *Artemia* y una microdieta (300-500 µm) preparada con 49,5 % proteína, 8,8 % lípidos y 9,7 % de ceniza (García-Gasca *et al.*, 2006). Dentro de los trabajos más relevantes podemos encontrar: destete con dietas micro-particuladas (García-Ortega *et al.*, 2003), los efectos de implantes de liberación controlada e inyecciones de LHRHa (Duncan, *et al.*, 2003), efecto del tratamiento del agua y la aireación en el porcentaje de eclosión de huevos (Komar *et al.*, 2004), el efecto de LHRHa en la expresión de moléculas relacionadas con estrés en el ovario de peces silvestres (Barrón-Vivanco *et al.*, 2005) y el desarrollo del tracto digestivo, la actividad de la tripsina y la expresión de genes en los huevos y larvas (García-Gasca *et al.*, 2006).

10.2. REPRODUCCIÓN DE PECES DE AGUA DULCE EN LATINOAMÉRICA

10.2.1. Introducción

En los últimos años, la actividad piscícola continental en Latinoamérica, al igual que en todo el mundo, registra una de las mayores tasas de crecimiento (FAO, 2003). En volumen y diversidad de biotecnologías en las actividades de reproducción realizadas en pisciculturas de agua dulce en Latinoamérica, predominan aquellas aplicadas en sistemas de cultivo intensivo y semi-intensivo con especies introducidas como los salmónidos y truchas. El Cuadro 1 resume algunos parámetros biométricos y reproductivos de algunas especies de interés para la acuicultura de Latinoamérica.

Luego de estas, se encuentra un listado muy largo de especies nativas cuya producción en pisciculturas se encuentra en fase experimental o con muy pequeñas producciones en diferentes países de América Latina (Cuadro 2).



CUADRO 1.
Parámetros biométricos y reproductivos de las especies de interés
para la acuicultura en Latinoamérica.

Nombre vulgar	Nombre científico	Talla reproductor (cm)	Peso reproductor (Kg)	Patrón reproductivo	Época desove	Fecundidad (N.º huevos)	Tamaño huevo (mm)	Tipo Ovario
Salmon Atlántico	<i>Salmo salar</i>	Hasta 120	Hasta 30	Iteroparo	Otoño-Invierno	1.000-1.500/Kg	4-7	Gimnovárico
Trucha arco iris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Aprox. 50	Aprox. 3-4	Iteropara	Otoño-Invierno	1.000/Kg	3-7	Gimnovárico
Salmon coho	<i>O. kisutch</i>	Aprox. 50	Aprox. 3-4	Semelparo	Otoño-Invierno	1.000-1.500Kg	5-8	Gimnovárico
Tilapias (varias especies)	<i>Oreochromis sp.</i> <i>Tilapia sp.</i>	Aprox. 25	Aprox. 0,6	Iteroparo	Todo el año	10.000/año 46.000/año	1	Cistovárico
Carpas (varias especies)	<i>Cyprinus carpio</i>	Sobre 30	Hasta 10	Iteroparo	Primavera-verano	100.000/año	0,8-1,0	Cistovárico
Pejerrey argentino	<i>Odontesthes bonaerensis</i>	Hasta 50	Aprox. 0,4	Iteroparo	Primavera-otoño	Hasta 45.000/año	1	Cistovárico
Pacu	<i>Colossoma bidens</i>	Hasta 85	Hasta 20	Iteroparo	Todo el año	1.110.000	2,7-2,9	Cistovárico
Tambaqui	<i>Colossoma macropomum</i>	Hasta 90	Hasta 30	Iteroparo	Todo el año	700.000	4,0-4,3	Cistovárico
Puye	<i>Galaxias maculatus</i>	Hasta 16	Máx. 0,01	Iteroparo	Otoño y primavera	240	1	Gimnovárico
Puye grande	<i>G. platei</i>	Hasta 30	Hasta 1	Iteroparo	Otoño	55.000	1	Gimnovárico
Arctic charr	<i>Salvelinus alpinus</i>	50-80	1-4	Iteroparo	Otoño-Invierno	1.500/Kg	5-7	Gimnovárico

CUADRO 2.
Listado de especies nativas de Latinoamérica cuyo cultivo se encuentra
en fase experimental en algunos países.

Nombre científico	Nombre común	Argentina	Brasil	Bolivia	Chile	Colombia	Cuba	Ecuador	Guatemala	México	Paraguay	Perú	Panamá	Uruguay	Venezuela
<i>Aequidens rivulatus</i>	Vieja							X							X
<i>Ageneiosus pardalis</i>	Doncella					X									
<i>Algansea lacustris</i>	Acúmara														X
<i>Amphilophus citrinellus</i>	Mojarra rayada									X					
<i>Ampularia haustum</i>								X							
<i>Arapaima gigas</i>	Arapaima, paiche		X	X		X						X			
<i>Astronotus ocellatus</i>	Apaiari, Acarahuazu		X			X						X			
<i>Atractosteus spatula</i>	Catán									X					
<i>Atractosteus tropicus</i>	Pejelagarto									X					
<i>Basilichthys australis</i>	Pejerrey				X										

Continúa



Continuación

Nombre científico	Nombre común	Argentina	Brasil	Bolivia	Chile	Colombia	Cuba	Ecuador	Guatemala	México	Paraguay	Perú	Panamá	Uruguay	Venezuela
<i>Brachyplatystoma sp.</i>	Pez gato		X			X						X			X
<i>Brycon cephalus</i>	Matrinchá		X												
<i>Brycon erythropterus</i>	Sábalo cola negra											X			
<i>Brycon moorei</i>	Dorada, Mueluda					X									
<i>Brycon orthotaenia</i>	Matrinchá		X												
<i>Brycon sp.</i>	Sábalo		X			X		X				X			X
<i>Callophysus macropterus</i>	Mapurito, Mota					X									
<i>Caquetaira kraussii</i>	Mojarra														X
<i>Caquetaia umbrifera</i>	Mojarra negra									X					
<i>Chirostoma estor</i>	Pescado blanco									X					
<i>Chirostoma humboldtianum</i>	Charal de Xochimilco									X					
<i>Chirostoma promelas</i>	Charal boca negra									X					
<i>Chirostoma spp.</i>	Charal									X					
<i>Cichla monoculus</i>	Tucunari		X	X		X						X			X
<i>Cichla ocellaris</i>	Tucunaré común, Pavón														X
<i>Cichlasoma festae</i>	Mojarra							X							
<i>Cichlasoma spp.</i>	Bujurqui, acará		X									X			
<i>Cichlasoma trimaculatum</i>	Mojarra prieta									X					
<i>Cichlasoma urophthalmus</i>	Mojarra del Sureste									X					
<i>Clarias maculatus</i>	Mandí		X												
<i>Colossoma bidens</i>	Pirapitinga		X			X									
<i>Colossoma macropomum</i>	Gamitana, Chachama, Paco, Tambaquí		X	X		X	X					X	X		X
<i>Colossoma mitrei</i>	Pacu		X												
<i>Crenicichla anthurus</i>	Anaxhua, Botello, Bocón							X							
<i>Curimata sp.</i>												X			
<i>Curimatorbis boulengerii</i>	Dica							X							

Continúa



Continuación

Nombre científico	Nombre común	Argentina	Brasil	Bolivia	Chile	Colombia	Cuba	Ecuador	Guatemala	México	Paraguay	Perú	Panamá	Uruguay	Venezuela
<i>Galaxias maculatus</i>	Puye	X			X										
<i>Galaxias platei</i>	Tollo, Puye grande	X			X										
<i>Hoplias malabaricus</i>	Dientón, Tararira	X	X												
<i>Hoplias microlepis</i>	Juanchiche							X							
<i>Hypophthalmus spp.</i>	Mapara		X			X						X			
<i>Ichthyolephas humeralis</i>	Bocachico							X							
<i>Lepisosteus tropicis</i>	Catán														X
<i>Leporinus copelandii</i>			X												
<i>Leporinus elongatus</i>	Piau verdadeiro, Boga		X												
<i>Leporinus macrocephalus</i>			X												
<i>Leporinus muyscorum</i>	Cuatrojos					X									
<i>Leporinus octofasciatus</i>	Piavá		X												
<i>Leporinus sp.</i>	Piaucu		X												
<i>Leporinus trifasciatus</i>	Cheo, lisa, mije		X			X						X			X
<i>Lophosilurus alexandri</i>	Pacamá		X												
<i>Mylossoma spp.</i>	Palometa, paca		X			X						X			X
<i>Mylossoma duriventris</i>	Palometa														X
<i>Nematogenys inermis</i>	Bagre				X										
<i>Odonthestes bonariensis</i>	Pejerrey	X	X	X								X		X	
<i>Odonthestes hatcheri</i>	Pejerrey patagónico	X													
<i>Osteoglossum bicirrhosum</i>	Arahuana		X			X						X			
<i>Oxidora niger</i>	Sierra mata, turushuqui		X			X						X			
<i>Paulicea lutkeni</i>	Pacamu, cunchimama		X			X						X			
<i>Pellona spp.</i>	Sardina		X									X			

Continúa



Continuación

Nombre científico	Nombre común	Argentina	Brasil	Bolivia	Chile	Colombia	Cuba	Ecuador	Guatemala	México	Paraguay	Perú	Panamá	Uruguay	Venezuela
<i>Petenia kraussi</i>	Mojarra de río														X
<i>Petenia splendida</i>	Tenguayaca									X					
<i>Petenia umbrifera</i>	Mojarra negra									X					
<i>Phractocephalus hemiolipterus</i>	Cajaro, pirarara		X			X						X			X
<i>Piaractus brachipomus</i>	Prapitinga, Cachama, Paco, Morocoto, Pacu		X	X		X		X				X			X
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	Pirapitinga, Cachama, Paco, Morocoto, Pacu	X	X												X
<i>Pimelodus clarias</i>	Mandí		X												
<i>Pimelodus grosskopfii</i>	Capaz														X
<i>Pimelodus sp.</i>	Pez gato														X
<i>Pinirampu sp.</i>	Pez gato														X
<i>Plagioscion spp.</i>	Corvina		X			X						X			X
<i>Potamorrhina sp.</i>	Yahuarachi, branquinha		X									X			
<i>Practocephalus sp.</i>	Pez gato														X
<i>Prochilodus lineatus</i>	Sábalo rayado		X												
<i>Prochilodus nigricans</i>	Bocachico			X								X			
<i>Prochilodus platensis</i>	Sábalo	X	X												
<i>Prochilodus reticulatus</i>	Bocachico					X									X
<i>Prochilodus scrofa</i>	Curimbatá		X												
<i>Prochilodus sp.</i>	Curimbatá		X			X		X				X			X
<i>Pseudodoras niger</i>	Guitarrilla														X
<i>Pseudopimelodus sp.</i>	Pez gato														X
<i>Pseudoplatystoma coruscans</i>	Surubí		X												
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	Doncella, Bagre, rallado, surubí		X	X		X						X			X
<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	Bagre, tigre		X			X						X			
<i>Pterygoplichthys spp.</i>	Carachama, cucha		X			X						X			

Continúa



Continuación

Nombre científico	Nombre común	Argentina	Brasil	Bolivia	Chile	Colombia	Cuba	Ecuador	Guatemala	México	Paraguay	Perú	Panamá	Uruguay	Venezuela
<i>Pygocentrus nattereri</i>	Piraña		X									X			
<i>Raphiodon vulpinis</i>	Machete, chambira		X			X						X			
<i>Rhamdia hillari</i>	Bagre, mandí		X												
<i>Rhamdia quelen</i>	Capitanejo, Bagre negro	X	X												
<i>Rhamdia sapo</i>	Bagre negro	X												X	
<i>Rhamdia sp.</i>	Jundiá					X								X	
<i>Salminus maxillosus</i>	Dorado	X	X												
<i>Shizodon fasciatus</i>	Lisa, boga, cheo		X	X		X						X			
<i>Schizodon knerii</i>			X												
<i>Semaprochilodus spp.</i>	Jaraquí, Zapoara, Bochachico		X			X						X			X
<i>Serrasalmus rhombeus</i>	Piraña		X			X						X			
<i>Sorubim lima</i>	Paletón														X
<i>Sorubim sp.</i>	Pez gato														X
<i>Synodontis schall</i>	Bagre ameritto														X
<i>Thorichthys meeki</i>	Mojarra Boca de Fuego									X					
<i>Trachycoristes galeatus</i>	Novia Cunchi		X									X			
<i>Triporthus spp.</i>	Sardina		X												
<i>Triurobrycon lundii</i>	Piracanjubi		X												
<i>Vieja bifasciata</i>	Mojarra Panza Colorada									X					
<i>vieja synspila</i>	Mojada Paleta									X					

Se recomienda la revisión del trabajo de Munro (1990), quien describe los factores ambientales que regulan la reproducción de peces tropicales donde incluye los periodos de desove de varias especies nativas de Latinoamérica.

La información disponible respecto de muchas especies nativas de interés para la acuicultura, se caracteriza por encontrarse muy dispersa y además no está disponible en revistas indexadas que puedan ser



consultadas a través de bases de datos electrónicas, lo que facilitaría su uso y, aseguraría su validez.

10.2.2. *Acipenseridae* (esturiones)

En Uruguay, se ha introducido recientemente el esturión siberiano, *Acipenser baerii baerii* planificándose una producción de 15 t de caviar para la temporada 2007 - 2008. Esta especie también ha sido introducida desde Rusia en el Sur de Chile y aún no se realiza una producción comercial con esta especie, aunque se ha determinado la metodología de producción de alevines y juveniles. El cultivo de larvas se realiza en estanques de fibra de vidrio de 1,5m de diámetro y 25cm de profundidad, durante 30 a 40 días hasta alcanzar un peso de dos a tres gramos (Aquanoticias, 1998).

También el esturión blanco, *Acipenser transmontanus* fue introducido en Chile desde California en el año 1993. En esa fecha se introdujeron larvas de 0,015 g y juveniles de 15 a 100 g, pero su cultivo aún se encuentran en fase experimental.

Se recomienda la revisión del libro de Dettlaff *et al.*, (1993), quienes realizan una muy buena revisión de la biología reproductiva de los esturiones y de las condiciones para su manejo en condiciones de cultivo.

10.2.3. *Atherinopsidae* (charales y pejerreyes)

10.2.3.1. *Odontesthes bonariensis* (pejerrey)

En Argentina, Ringuelet (1943) publica un texto sobre piscicultura del pejerrey y Reartes (1995) describe los métodos de cría y cultivo masivo de esta especie, sin embargo, a la fecha no existen estadísticas de producción de ella y las pequeñas producciones se destinan mayoritariamente a la siembra para pesca deportiva. La Estación Hidrobiológica de Chascomús ubicada en la Provincia de Buenos Aires, fue creada en 1942 y en la actualidad está destinada a la piscicultura del pejerrey. Hoy cuenta con un plantel de cerca de 800 reproductores que permiten independizar la producción de alevines de la captura de reproductores silvestres, siendo capaces de producir diez millones de huevos al año con una fertilidad del 75%. Las larvas son cultivadas



en forma intensiva y en la actualidad se evalúa la utilización de jaulas flotantes para la cría semi-intensiva de juveniles de esta especie (M. Velasco, comunicación personal).

10.2.4. *Characidae* (carácidos)

La mayor producción de estas especies nativas de Sudamérica se realiza en Brasil, debido a que superó las 5.000 t en el año 2006, aunque también se registran producciones menores en Venezuela, Perú, Colombia, Panamá y Argentina. Woynarovich y Woynarovich (1998), realizan una revisión de la situación taxonómica y además, una completa descripción de la tecnología de cultivo de estas especies. Dentro de las características que potencian el cultivo de este grupo de organismos, Woynarovich y Woynarovich (1998) señalan como las más importantes:

1. Son omnívoros eurifágicos.
2. Aceptan muy bien el alimento artificial.
3. Presentan buenas tasas de crecimiento.
4. Son poco sensibles a las condiciones de cultivo o tipo de estanque.
5. Toleran el policultivo.
6. Todos los estados del desarrollo pueden ser manejados fácilmente.
7. Toleran bien aguas de alta productividad y bajo pH.

Parte importante de la producción de estas especies (el 80 % en Venezuela según Botero *et al.*, 2004), se basa en la aplicación de hibridación entre machos de cachama blanca (*P. brachypomus*) y hembras de cachama negra (*C. macropomum*) con el fin de expresar vigor híbrido en las tasas de supervivencia y crecimiento.

10.2.4.1. *Colossoma macropomum* (cachama negra o tambaqui)

Existen registros de «pequeñas» producciones en sistemas extensivos, semi-intensivos y/o policultivo de esta especie nativa con una producción para el año 2005 de 5.331 t sólo en Brasil. Además, se cultiva en Colombia donde se reportan 13.445 t de producción en el año 1999 y en otros países como Venezuela, Ecuador y Perú. Sólo en Venezuela existen entre 150 y 200 granjas de cultivo de cachama negra (Jory *et al.*, 1999). Estas



producciones se realizan a pequeña escala y el producto final es comercializado en el mercado local, aunque cada vez aumenta el interés de restaurantes por ofrecerlo en su menú, además, de ser muy apreciados por la pesca deportiva y como peces de ornato.

Las especies del género *Colossoma* no presentan dimorfismo sexual por lo que únicamente en el periodo reproductivo es posible diferenciar machos de hembras, aunque existen pequeñas diferencias morfológicas entre los sexos que son imposibles de diferenciar visualmente durante el cultivo (Pineda *et al.*, 2004). En la naturaleza, desovan en aguas corrientes de áreas recién inundadas durante la época de lluvias, en la amazonía peruana se reproduce entre los meses de octubre a diciembre y alcanza su madurez sexual a los cuatro años de edad (FON-DEPES, 2006 y Eufrazio y Palomino, 2006). Durante la época reproductiva, forman cardúmenes de especímenes desde 5 a 25 kg.

La proporción sexual regularmente es de 2 machos por 1 hembra, producto de la temprana madurez (un año antes) de los machos. Sus huevos son flotantes, con solo un micropilo y sin adherencia, por lo que son arrastrados por la corriente hacia los sitios de inundación.

A pesar de su tolerancia al cautiverio, estas especies son especialmente sensibles a factores estresantes que incrementan los niveles plasmáticos de cortisol, especialmente durante las épocas de ayuno (Krieger-Azzolini *et al.*, 1989). Los reproductores pueden ser cultivados en estanques, tanques o jaulas a densidades que van desde 80 a 200 individuos por 1.000 m². Como en otras especies, para que la inducción mediante cualquier método utilizado sea efectiva, las hembras deben tener sus ovocitos en vitelogénesis avanzada. Woynarovich y Woynarovich (1998) sugieren que para las especies del género *Colossoma*, se puede utilizar como indicadores de la condición de madurez:

1. La Inflamación y apertura de la papila urogenital.
2. La abertura sexual y anal emergen y son de un color rojo oscuro o rosado.
3. La parte posterior del abdomen es abultado y suave. El ovario puede ser palpado fácilmente con los dedos.

La madurez de los machos se puede determinar fácilmente mediante un suave masaje abdominal para observar la presencia de esper-



ma fluyente. Las hembras maduras son trasladadas a estanques de 2,5-3,0 m x 1,2 m. La profundidad del agua debe mantenerse entre 30 y 50 cm. La inducción de la madurez sexual se puede realizar en estas especies mediante la aplicación de extractos de hipófisis (e.i. carpa), en hembras se aplican 2 inyecciones de forma intraperitoneal por debajo de las aletas pélvicas. La primera de 0,4-0,5 mg kg⁻¹ y la segunda de 18 a 22 h después de >5 mg kg⁻¹ y los machos se inducen ya sea con 2 inyecciones, la primera de 0,5 mg kg⁻¹ y la segunda de 1,0 mg kg⁻¹ ó una única inyección de 1-2 mg kg⁻¹. Estas especies también son inducidas mediante la inyección de GnRHa, regularmente se utiliza una dosis de esta hormona sintética a una concentración de 5-6 µg kg⁻¹ para las hembras y 0,8 - 1,0 µg kg⁻¹ en machos. Además, la hormona puede ser acompañada de una dosis de 5 mg kg⁻¹ de domperidona o pimo-zida. Hernández (1992), realiza una descripción de los tratamientos y dosis hormonales para la inducción de la maduración utilizados en los diferentes países.

El periodo entre la aplicación de la hormona y la ovulación es inversamente proporcional con la temperatura de cultivo. Éste se calcula en base a la cantidad de hora-grado (h°) necesarios para la ovulación y se calcula sumando la temperatura del agua cada hora después de la última inyección (si fue más de una) hasta que se produzca la ovulación. En peces del género *Colossoma* se requieren aproximadamente 260 h° con extracto de hipófisis y 380 h° si se utiliza GnRHa para alcanzar la maduración final del ovocito y la ovulación. Seguido a la aplicación del tratamiento hormonal, se debe suturar la abertura genital de las hembras para evitar la liberación de los óvulos en los estanques.

Se recomienda revisar Woynarovich y Woynarovich (1998) quienes describen la metodología a seguir para extraer los gametos y practicar la fecundación artificial en los peces de estos géneros. Además, realizan una muy buena descripción del manejo de las larvas.

10.2.4.2. *Piaractus mesopotamicus* (pacu o paco)

El pacu registra una producción de 1.184 t en Brasil y en Argentina se ha iniciado recientemente su producción industrial. Además, entre estas dos especies (*C. macropomum* y *P. mesopotamicus*) se produce un híbrido (el tambacu) con una producción anual para el año 2005



de 35 t en Brasil. Esta especie es de hábitos alimenticios omnívoros. Los trabajos realizados por Bechara, 2000 y Wicki, 1987, describen el efecto de la densidad de cultivo y el efecto de la dieta en el crecimiento. Concluyen que la dieta debe contener un mínimo de 20 % de proteína, aunque el alimento continua siendo la mejor opción para los reproductores el cual puede suplementarse con alimento artificial. Luchini y Wicki (Comunicación personal) alimentan los reproductores con pienso balanceado con 32 % de proteína bruta y los especímenes alcanzan tallas de 1,5 a 2,0 kg en 16 meses. La temperatura óptima para reproductores es cercana a 25 °C y los niveles ideales de oxígeno deben encontrarse entre 6 a 8 mg L⁻¹. Recomendando un mínimo de oxígeno de 4-5 mg L⁻¹ y no superar los 30 kg m⁻² en el cultivo en jaulas con recambio de agua cercanos a 4 a 6 L seg⁻¹ ha⁻¹, aunque en verano debe aumentarse por la pérdida en las concentraciones de oxígeno disuelto. Püllela (1997) describe la acuicultura del pacu y su relación con parámetros microbiológicos que entregan información valiosa para el cultivo de esta especie. El incremento de la productividad en el interior de los estanques, es recomendable realizarlo con estiércol de pollo y cerdo. Además, su alimentación puede ser complementada con alimento fresco producido en los mismos estanques de cultivo de la granja como caracoles acuáticos de los géneros *Ampullaria* y *Planorbis*. Woynarovich y Woynarovich (1998) recomiendan utilizar pienso para gallinas o patos en dosis diarias de entre el 1,5 a 3,0 % de la biomasa. Estas especies maduran adecuadamente en cualquier tipo de estanque, pero sólo alcanzan la madurez sexual plena y la ovulación en sistemas con aguas corrientes, razón por la cual en cautiverio no son capaces de alcanzar la maduración final de los ovocitos y deben ser inducidos artificialmente para alcanzar la maduración final de estos (Fresneda et al., 2004).

La pubertad se produce regularmente entre los 4-5 años de edad a un tamaño de 5-7Kg y regularmente en forma asincrónica entre los especímenes de una cohorte (40 a 60 % de las hembras). Como en muchas otras especies, la madurez de los machos se produce con mucha facilidad y con buena calidad de gametos. Sin embargo, las hembras son más exigentes y requieren de condiciones muy específicas de cultivo para producir una buena calidad de ovocitos. Muchas de las dis-



funciones reproductivas que sufren las hembras, pueden ser superadas induciendo la ovulación. Se recomienda revisar el trabajo de Luchini (1990), quien realiza una descripción sobre técnicas de reproducción inducidas en peces nativos de Sudamérica. En el manejo reproductivo de estas especies, se registran bioensayos para la criopreservación de semen (Navarro *et al.*, 2004; Fresneda *et al.*, 2004) con resultados esperanzadores que permiten obtener una fertilidad cercana al 30 % en promedio (Coser y Godinho, 1987) y el efecto de la densidad de cultivo de alevines de *Piaractus* sp. en el crecimiento y la supervivencia (Bernardino y Ferrari 1989; Rebaza *et al.*, 2002). La optimización de estas técnicas, mejorarán los resultados productivos obtenidos hasta la fecha, ya que con frecuencia se han registrado reducciones importantes en la variabilidad genética de las poblaciones de cultivo producto de la reducción del tamaño de las poblaciones que se mantienen en cautiverio (Pineda, 2004).

10.2.5. *Cichlidae* (tilapias)

En general, las tilapias son especies originarias de África, pero en la actualidad se encuentran distribuidas por todo el mundo. Son capaces de adaptarse a condiciones ambientales muy diversas (e.i. amplio rango de temperatura y salinidad) y los manejos reproductivos aplicados en su cultivo, son fáciles de realizar en forma exitosa, haciendo que muchas veces deban ser cultivadas en policultivo con especies carnívoras con el fin de controlar las poblaciones de tilapias (Huet, 1998).

Las tilapias son uno de los grupos de peces de mayor producción a nivel mundial y en la actualidad varios países de Latinoamérica (Brasil, México y Ecuador, entre otros) están incrementando su producción con el fin de ser comercializados hacia Estados Unidos, país en donde se incrementa su consumo en forma paulatina. En la región Centro-Norte de Sudamérica y Centroamérica se registra una producción intensiva de más de 266.257 t (Castillo, 2006). Las diferentes especies de tilapia que se cultivan en Latinoamérica y sus principales características fenotípicas y productivas pueden ser revisadas en Castillo (2006). Además, Rana (1988); Macintosh y Little (1995) entregan importantes antecedentes sobre la biología reproductiva y manejo en cultivo de este grupo de peces.



Son especies dioicas, los machos poseen dos orificios ventrales, el ano y el orificio urogenital, y las hembras poseen tres, el ano, el poro genital y el orificio urinario (Huet, 1998).

La pubertad se produce muy tempranamente, con aproximadamente 15 cm de longitud total y sólo algunos meses de vida, dependiendo de las condiciones ambientales y de manejo. Aunque la fecundación es externa, varios grupos de tilapias micrófagas (*Tilapia mossambica* y *macrochir*) presentan incubación bucal de sus embriones, incluso después de varios días de haber nacido, los alevines buscan protección en la cavidad bucal de su madre. Regularmente en condiciones de cultivo, la fecundación ocurre en un nido (de forma y tamaño muy variable entre las diferentes especies) preparado por el macho en el fondo del estanque, luego de la fecundación, la hembra cuida los embriones del ataque de depredadores y luego los lleva hasta su boca. En la cavidad bucal aumenta el número de pliegues del epitelio y se desarrolla la «glándula faríngea», cuya secreción puede tener funciones antibióticas que aumentan la supervivencia de los embriones (Rana, 1988). Como en muchas especies, el tamaño de los ovocitos es directamente proporcional al tamaño de la hembra, esto hace que hembras de mayor tamaño tengan ovocitos más grandes y una mayor fecundidad total, sin embargo, registran una fecundidad relativa menor (Rana, 1988).

Regularmente, el esfuerzo reproductivo en las hembras es muy alto, por lo que su crecimiento y rendimiento de canal son muy bajos, razón por la cual, en los sistemas de cultivo se prefiere el cultivo de poblaciones de machos. La producción de estas poblaciones «Monosexo» se puede realizar sexando los grupos que se cultivan, ya que la expresión de los caracteres sexuales se produce tempranamente, pero esto es poco efectivo ya que basta el sexaje errado de algunos individuos para activar la reproducción en la cohorte cultivada.

En la producción intensiva de estos peces, se utiliza masivamente la inducción sexual (o control fenotípico del sexo) suministrando hormonas esteroideas masculinas en el alimento por un corto periodo de tiempo. Las dosis van desde 5 hasta 60 mg kg⁻¹ de alimento suministrado y la supervivencia de los especímenes tratados son similares a los normales. Estos esteroides modifican la expresión fenotípica del sexo de los individuos, incrementado significativamente el porcentaje



de machos en los grupos cultivados. Esta práctica no puede ser utilizada en especímenes destinados al mercado europeo o de Estados Unidos, razón por la cual, puede ser aplicada sólo para producciones de comercialización interna.

El sexo genético en las tilapias está determinado por los cromosomas sexuales. Se conocen dos mecanismos para la determinación del sexo en las diferentes especies de tilapias, el sistema XY y WZ. En el primero, los machos son heterogaméticos y los presentan especies como *O. mosambicus* y *O. niloticus*. En el segundo, las hembras son las heterogaméticas y lo presentan las especies *O. hornorum* y *O. aureus*. Desde 1960, se han producido híbridos interespecíficos de tilapias los que se caracterizan por presentar poblaciones formadas por altos porcentajes de machos. Por ejemplo, si se cruzan especímenes machos (ZZ) de las especies *O. hornorum* o *O. aureus* con hembras (XX) de las especies *O. niloticus* o *O. mosambicus*, la descendencia es 100 % machos en la mayoría de los casos. Otra alternativa para la producción de poblaciones «Monosexo» es la utilización de «supermachos», especímenes genéticamente YY cuyo cruzamiento con hembras normales XX permiten la obtención de descendencia masculina. Las producciones más exitosas se realizan con «supermachos» de *O. niloticus*. Para mayor información se puede revisar Mair y Abejlla (1997) y Castillo (2006).

En la actualidad, estas biotecnologías permiten disponer de una gran variedad de híbridos y líneas genéticas que optimizan la producción en sistemas super intensivos en agua dulce y salada, lo que sumado a los hábitos alimenticios desde micrófagos, herbívoros y omnívoros de estas especies, logran asegurar un incremento significativo de la producción de tilapias en Latinoamérica debido al permanente incremento en su demanda.

10.2.6. *Ciprinidae* (Carpas)

Las carpas registran una importante actividad piscícola, especialmente en sistema extensivos en la región Centro-Norte de Sudamérica y América Central en la que alcanza una producción de 129.500 t (Remedios, 2002). La producción de ciprínidos en Latinoamérica se basa esencialmente en las especies que han sido introducidas en la



región. El interés de la introducción de estas especies es debido a que tienen un crecimiento rápido, una carne relativamente apreciada y sobre todo, que se alimentan de vegetales o plancton no utilizados o insuficientemente demandados por otras especies. Además, toleran un amplio rango de temperaturas y factores físico químicos del agua que permiten su producción en cualquier tipo de ambiente. En la actualidad, estas especies no registran una producción industrial importante, pero sí son utilizadas en programas de acuicultura rural de pequeña escala (básicamente utilizando sistemas extensivos en mono o policultivo), lo que permite generar proteína animal de buena calidad con desechos de las actividades agrícolas y ganaderas desarrolladas en la región.

Dentro de las principales especies de carpas que se encuentran en Latinoamérica, la más utilizada es la carpa común, *Ciprynus carpio*, la carpa herbívora, *Ctenopharingodon idella*, la carpa plateada, *Hypophthalmichthys molitrix* y la carpa cabezona, *Aristichthys nobilis*. Para profundizar en aspectos de la taxonomía, distribución geográfica, ciclos de vida, alimentación y reproducción de carpas, se recomienda revisar el trabajo de Windfield y Nelson (1991).

La reproducción de los ciprínidos de cultivo está controlada por una serie de factores ambientales, uno de los factores últimos más importantes para la mayoría de las especies, es la temperatura, aunque también pueden influir en distinta manera, algunos factores como el nivel del agua, la calidad del agua, la disponibilidad de nutrientes, el tipo de sustrato y la presencia de vegetación durante el periodo reproductivo (Hontela y Stacey, 1990). La carpa común, regularmente desova a comienzos del verano, la recrudescencia gonadal se inicia inmediatamente y el crecimiento gonadal se completa en 6 a 8 semanas después del desove. Las gónadas se encuentran en estado de reposo durante de todo el invierno y la maduración final se completa a principios de primavera antes del desove. Hontela y Stacey (1990) realizan una muy buena descripción de los factores endocrinos que regulan la maduración sexual en machos y hembras de ciprínidos, aunque las hormonas que regulan este proceso son las mismas detectadas en otras especies. La reproducción artificial en las actividades de piscicultura extensiva



de ciprínidos en Latinoamérica se basa utilizando dos modelos básicos de reproducción:

Reproducción Natural

Cultivo en una fase. Esta técnica de reproducción se utiliza en cultivos muy básicos, implica la utilización de un estanque mixto en el que son mantenidos los reproductores y después de una temporada de reproducción, los alevines son mantenidos hasta varios meses después de su nacimiento en el mismo estanque. Regularmente, los estanques son grandes de 0,5-2,0 ha y de 1,0-1,25 m de profundidad. Este sistema suprime toda manipulación de los peces, se mantienen condiciones relativamente estables en la calidad del agua. La principal desventaja son los resultados aleatorios que se obtienen, ya que no se lleva un registro claro de la cantidad de alevines producidos en la temporada.

Cultivo en dos fases. Básicamente, utiliza dos estanques, uno de puesta y otro de alevines. Después del nacimiento, los alevines se dejan en el estanque durante algunos días o semanas, para posteriormente ser trasladados a un estanque especial para los peces en crecimiento (Huet, 1998).

Reproducción Artificial

La reproducción artificial de las carpas es una de las primeras actividades reproductivas realizadas por el ser humano con especies acuáticas de cultivo, ya en el año 460 AC, Fan Li escribió El Tratado de Piscicultura, primer texto sobre el cultivo de peces de agua dulce basado en el cultivo de carpas en la ciudad de Wuxi, China (NACA, 1989).

Aunque las carpas pueden realizar todas las etapas del ciclo reproductivo en cautiverio, la reproducción artificial permite optimizar los resultados productivos obtenidos con estas especies. Las principales dificultades asociadas a la reproducción artificial de carpas se encuentran en lograr masivamente la maduración final de los ovocitos y manejar adecuadamente la alta adherencia de estos. Según Woyanovich y Horváth (1981), las condiciones naturales que son decisivas para determinar el desove de la carpa común en condiciones de cultivo, son las siguientes:

1. Agua a temperatura entre 18-22 °C
2. Zona de desove cubierta de hierbas



3. Agua saturada de oxígeno disuelto
4. Lento aumento del nivel del agua
5. Presencia del otro sexo
6. Ausencia de otros peces, en particular carnívoros

Cuando la maduración final del ovocito no se alcanza bajo determinadas condiciones de cultivo, existen una serie de técnicas utilizadas que permiten inducir artificialmente la madurez plena de los especímenes. En carpas, ya se encuentran bien estandarizados los siguientes métodos para la sincronización de la maduración:

Hipofisación de los reproductores. Para que sea efectiva se requiere que los especímenes se encuentren en la fase final de la maduración sexual, es decir, con la vesícula germinal en migración. La hipofisación se realiza frecuentemente mediante inyección intramuscular, hacia la parte anterior del cuerpo, a la altura del primer radio de la aleta dorsal, a medio camino entre esta aleta y la línea lateral, a unos 2-3cm de profundidad. Regularmente se utiliza una dosis de una hipófisis por kilo de hembra en 1cm³ de solución de inyección para dos hipófisis. Para cada macho, basta con una hipófisis por cm³ de solución. Una vez efectuada la hipofisación, los peces se dejan en reposo en agua de entre 17-20 °C, la maduración se efectúa en unas 18 h (Huet, 1998) en forma exitosa en un 60-70 % de las hembras. En la carpa común, la ovulación es total. Sin embargo, en las hembras de más de 7-10 kg, la ovulación puede ser intermitente y es preciso proceder al desove artificial a intervalos de una hora durante 5-8 h (Woynarovich y Horváth, 1981).

Aplicación de GCH. Para inducir el desove de las carpas chinas, se utiliza frecuentemente GCH sola o mezclada con extractos de hipófisis. Cuando se realiza la fecundación artificial, se aplican 2 inyecciones: una preparatoria y otra decisiva. Se suministra primero un 10 % de la dosis y el 90 % restante se inyecta después de 18-24 h. Cuando la temperatura se encuentra dentro de los valores óptimos, se requieren 200-220 horas-grado (h°), aproximadamente para alcanzar la ovulación, lo que significa cerca de 9-11 h después de la inyección (Woynarovich y Hotváth, 1981). El uso de análogos para la inducción de la maduración de los ovocitos es escaso y se realiza fundamentalmente con fines experimentales.



10.2.7. *Ictaluridae* (bagres de agua dulce)

10.2.7.1. *Ictalurus punctatus* (bagre de canal)

Esta especie ha sido introducida en varios países de Latinoamérica (Chile, Colombia, Argentina, Brasil, Venezuela, México, entre otros). Sólo en México se producen más de mil doscientas toneladas al año, país donde existen más de 350 productores que realizan su producción en estanques y jaulas flotantes.

El bagre de canal inicia la madurez sexual a una talla de 20 cm y un peso aproximado de 350 g, tamaño que se alcanza aproximadamente al año de edad. Sin embargo, la plenitud de su madurez la logra en un peso de 1,5 a 5,0 kg y una edad que va desde 2 a 4 años. El inicio de los procesos de desove están en estrecha relación con el incremento de la temperatura del agua. La temperatura óptima para los desoves es de 27 °C (Stickney, 1993). En Chile, este periodo abarca desde diciembre a febrero (G. Caro com. per.) y en México desde marzo a julio (COLPOS, 2007).

Esta especie presenta dimorfismo sexual. El macho tiene la papila genital protuberante y alargada, su cabeza a diferencia de la hembra, es grande y ancha. El abdomen de la hembra, en cambio, es redondeado, igual que la papila genital. El color de la piel en los machos es gris oscuro y en las hembras es más claro (Dupree, 1995).

COLPOS (2007) en un curso sobre cultivo de bagres recomienda que una vez seleccionados los reproductores machos y hembras, se mezclan en estanques de 0,5 a 3,0 ha a una densidad de 1 pez/40m², guardando una proporción de 2 machos por 3 hembras. La biomasa total de reproductores no debe exceder 1.300 kg/ha. Se colocan «nidos» artificiales en los estanques, los que pueden ser tambores plásticos o cajas de madera (u otros materiales) instalados a una profundidad de 0,3 a 0,75 m, en los que la hembra pone los huevos y éstos son fecundados por el macho (Piper *et al.*, 1982).

Una vez que los huevos han sido fecundados, se extraen manualmente la masa de huevos del nido y se llevan a la sala de incubación, donde se colocan dentro de los sistemas de incubación que pueden ser de diferente naturaleza, los que deben disponer de niveles de oxígeno sobre 5ppm y agua circulante (revisar los trabajos de Stickney, 1993 y Dupree, 1995). Para controlar la incidencia de hongos durante la incubación, se recomien-



da aplicar formalina a 100 ppm durante 15 min con flujo cerrado. Se debe evitar aplicar el tratamiento un día previo a la eclosión. El tiempo de incubación es inversamente proporcional con la temperatura, en un rango de 26-28 °C, el embrión demora 8 días en eclosionar. Conforme avanza el desarrollo. El color del huevo cambia de amarillo tenue, a anaranjado y por último, rojizo. Después de la eclosión, las larvas nadan a través de la malla de la canastilla y forman una masa en el fondo de la pileta (COLPOS, 2007). Para la absorción del saco vitelino se requieren 130 a 280UTA, es decir, cerca de 7 días a 25°C. Durante este periodo la larva desarrolla la boca, su cuerpo anaranjado comienza a pigmentarse adquiriendo un aspecto oscuro. Una vez que nada libremente en la superficie del agua, es capaz de buscar y consumir alimento (Dupree, 1995).

La maduración final de los oocitos puede ser inducida utilizando extractos de pituitaria de diferentes especies y GCH en dosis de entre 300 a 1.800UI/kg en dosis simples o dobles (Barnabé, 1991 y Stickney, 1993). La fecundidad relativa de las hembras se encuentra entre 3.000 y 12.000 huevos/kg (Stickney, 1993).

10.2.8. *Osteoglossidae* (peces banda)

10.2.8.1. *Arapaima gigas* (arapaima o paiche)

Se debe destacar la gran potencialidad para el desarrollo de actividades piscícolas que tiene la cuenca del río Amazonas por la abundancia de agua y de especies. Destacan aquí la gran cantidad de especies cultivadas en forma experimental en países como Brasil, Colombia, Perú y Venezuela (Cuadro 2). *A. gigas* es la especie íctica de agua dulce de mayor tamaño del mundo y una de las especies de mayor potencialidad, ya que es capaz de alcanzar 10 a 12 kg de peso total al año (Yuto *et al.*, 2006; Saavedra y Quintero, 2007).

Según Saavedra (2007), esta es una especie gonocórica de maduración asincrónica que presenta caracteres sexuales secundarios sólo durante el periodo de madurez máxima, el que se expresa fundamentalmente por un dicromatismo sexual, donde el macho es más oscuro que la hembra. La papila genital de machos y hembras adultos difiere levemente, en la hembra tiene forma de roseta con pliegues y en el macho guarda una disposición lineal. La actividad reproductiva en esta especie está controlada



por el aumento de la disponibilidad de alimento en el periodo de aguas bajas y posteriormente la llegada del periodo de lluvias, el aumento del nivel fluviométrico, las variaciones en la conductividad, el fotoperiodo y la temperatura. El periodo del desove para la Amazonía peruana tiene su máxima intensidad de septiembre a diciembre, con un pico notable en el mes de noviembre, pero se observa reproducciones hasta abril. Para la Amazonia brasilera el periodo de lluvia y por ende de reproducción del pirarucú se presenta durante los meses de diciembre a junio.

La pubertad se presenta entre los 3 y 5 años. En las hembras, sólo es funcional uno de los ovarios de morfología cistovárica. En machos, también sólo uno de los testículos es funcional. Histológicamente, el epitelio seminífero del testículo del *A. gigas* muestra características distintas en comparación con la mayoría de los teleósteos. Los túbulos seminíferos no son formados por los procesos de las células de Sertoli, sino por las células yuxtapuestas. Esta especie realiza cuidado parental puesto que, dada la baja producción de ovas, deben minimizar la mortalidad de las crías. La hembra y el macho cuidan y limpian los huevos y crías al igual que defienden el territorio (Saavedra, 2007).

10.2.9. *Salmonidae* (Salmones y truchas)

La mayoría de las especies salmonídeas son anádromas, ocurriendo su reproducción sólo en agua dulce, razón por lo que se han incorporado como especies de «agua dulce» en este capítulo del libro. Para mayor información respecto de las tecnologías de cultivo y requerimientos medio ambientales del cultivo de salmónidos, se recomienda consultar a Edwards (1978), Bromage y Cumaranatunga (1988) y Blanco (1995).

La mayor producción de salmónidos de cultivo en Latinoamérica se realiza en Chile, país que en la actualidad es el segundo productor mundial de este grupo de peces y se espera que a corto plazo, sea el número uno. Para el año 2007 se espera exportar más de 640.000 t, esencialmente de los salmones del Atlántico y plateado, además de la trucha arcoiris. También, existen en el país pequeñas y esporádicas producciones de salmón boquinegra o chinook, *Oncorhynchus tshawytscha* y trucha marrón, *Salmo trutta*, esta última, cultivada esencialmente con fines de pesca deportiva. Recientemente, se ha introducido la trucha ártica o «arctic charr», *Salvelinus alpinus*, especie de la que se



han ejecutado pequeñas importaciones y aún no se realiza el ciclo biológico completo en el país. Para cumplir con los volúmenes de producción sólo en Chile se requieren más de 1.000 millones de ovas, de las cuales un 87,56 % son producidas en el país, ya que en la actualidad la importación de ovas se encuentra muy restringida por la legislación acuícola de Chile.

La producción de salmónidos en Chile en el año 2005 alcanzó un total de 614.139 t. Esta se basa en el cultivo de Salmón del Atlántico (SA), *S. salar* (Fig. 7) con una producción de 385.779 t, lo que representa el 62,81 % de la producción.

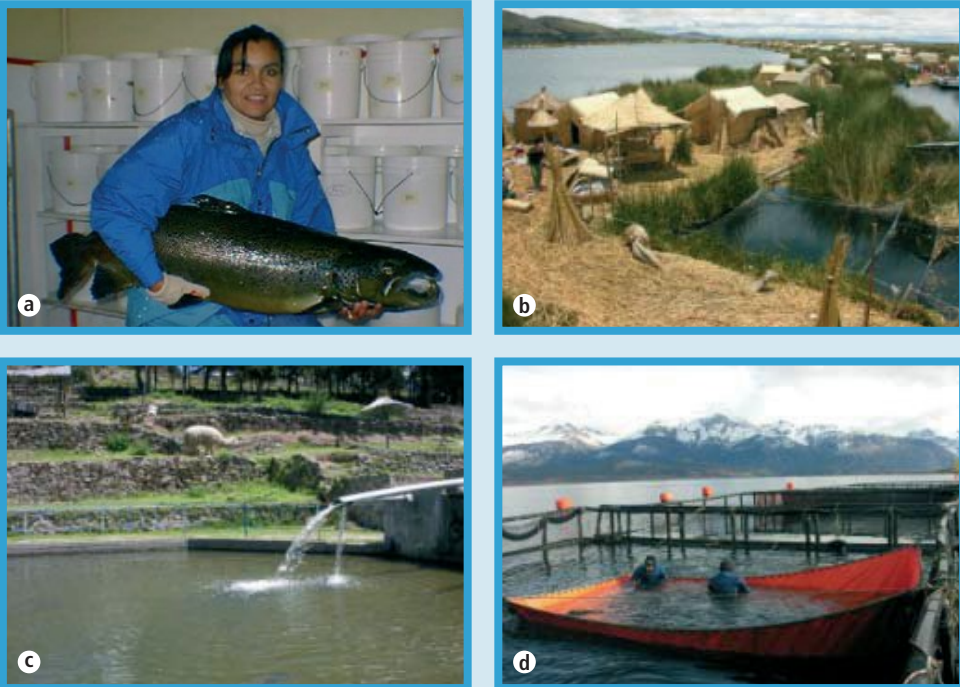


FIGURA 7.

a: Reproductor macho de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de tres inviernos en el mar cultivado en Chile. b: Sistema de jaulas implementado por los indios Uros en una isla flotante para el cultivo de trucha arcoiris en el lago Titicaca a 3.810msnm. c: Piscicultura Chucuito construida en el altiplano de Perú en 1939. d: Evaluación de madurez sexual en hembras de salmón Atlántico en el Sur de Chile.



El salmón plateado o coho (*Oncorhynchus kisutch*) registra una gran actividad industrial en el Sur de Chile con una producción de 102.494 t, representando un 16,68 % de la producción total de salmónidos en Chile. La trucha arcoiris (*O. mykiss*) es la segunda especie de importancia en Chile, con una producción industrial de 122.962 t, lo que representa el 20,02 % de la producción del país. Esta especie se cultiva en Perú y Bolivia a 3.800 m.s.n.m. en el lago Titicaca (Fig. 2) y sólo en el sector peruano se producen cerca de 5.000 t al año (Fig. 7), importando para ello más de 28 millones de ovas embrionadas desde Estados Unidos. Además, se registran pequeñas producciones en muchos países como Argentina, Bolivia, Brasil, Ecuador, México, Venezuela, entre otros.

Para la producción de ovas en Chile, varias fábricas de pienso elaboran alimento especial para reproductores, los que regularmente contienen menores niveles de lípidos y más proteínas que los alimentos de engorda (Cuadro 3). La dosis de alimento diaria que recibe un reproductor se encuentra frecuentemente entre 0,4 y 0,8 % del peso corporal por día (% PC) y son cultivados a densidades cercanas a 10 kg m^{-3} . La manutención de reproductores se realiza regularmente en balsas jaulas en agua salada (Edwards, 1978 y Barnabé, 1991), aunque en la actualidad algunas empresas de mayor producción están iniciando este proceso en estanques con sistemas de recirculación con el fin de minimizar el riesgo de contagio de enfermedades en los sistemas abiertos utilizados en el mar. Regularmente, los reproductores son trasladados al agua dulce cerca de un mes antes de la puesta, transportando los reproductores en camión o helicóptero en densidades de entre 50 y 80 kg m^{-3} de agua. Una vez que los especímenes llegan al agua dulce, no reciben alimentación (Gordon *et al.*, 1987).

La mayoría de las empresas desarrollan programas de selección genética basados en familias de sus planteles de reproductores, en los que se incluyen dos o tres características a mejorar, como por ejemplo: talla a la cosecha, velocidad de crecimiento, resistencia a enfermedades, color muscular, edad a la «smoltificación», color de piel, baja madurez precoz, entre otros (Gjerde, 1993).

**CUADRO 3.**

Composición química de dietas para salmónidos comercializadas en Chile por la empresa Salmofood.

Componente	Dieta engorda (%)	Dieta reproductores (%)
Proteínas	38,0	47,0
Proteína digestible	35,0	43,2
Lípidos	35,0	20,0
Carbohidratos	12,0	13,5
Fibra	1,0	0,6
Humedad	9,0	9,0

Regularmente, el periodo de puesta natural de los salmónidos ocurre en otoño-invierno en el Hemisferio Sur (esencialmente entre los meses de abril a julio), pero varias empresas que cultivan trucha arcoiris en agua fría (menos de 10 °C en forma constante) realizan desoves durante la primavera-verano al seleccionar especímenes que mantienen sus patrones reproductivos en función del Hemisferio Norte. Se recomienda revisar los artículos de Estay *et al.*, (1995a) y Estay *et al.*, (1999) en donde se realiza una evaluación del comportamiento reproductivo en Chile del salmón plateado y Atlántico, respectivamente. También, se aplica fotoperiodo artificial que permiten desplazar los periodos de puesta hacia meses en los que naturalmente los especímenes no lo hacen (Zanuy y Carrillo, 1987; Bromage, 1988; Bromage y Camarantunga, 1988; Scott, 1990; Pohl-Branscheid y Holtz, 1990; Dazarola *et al.*, 1999a y Bromage *et al.*, 2001). Esto es bastante frecuente en la trucha arcoiris y el salmón del Atlántico, ya que estas especies responden muy bien a los fotoperiodos artificiales. El salmón plateado en cambio, responde de forma menos sincrónica a los fotoperiodos artificiales.

En salmónidos, es muy frecuente el uso de inductores de la maduración final del ovocito o de la espermiación (Zanuy y Carrillo, 1987; Mylonas y Zohar, 2001; Zohar y Mylonas, 2001). Los más utilizados son implantes intramusculares o intraperitoneales de GnRHa en los que se incorpora algún inhibidor de la dopamina. También se utilizan inyecciones en suero fisiológico de LHRHa. La estrategia utilizada por las empresas, es esperar que maduren naturalmente entre un 10 y 20 % de los especímenes y luego inyectar a todos sus reproductores, sin



evaluar individualmente el estado de madurez de cada hembra. Con esto, sincronizan el periodo de desove y reducen los días en alcanzar el 100 % de hembras reproductoras desovadas.

La detección del momento de la ovulación, es clave para obtener altos porcentajes de fecundación, ya que la máxima capacidad fecundante de los gametos de salmónidos se produce cerca de cuatro días después de la ovulación (Gordon *et al.*, 1987 y Estay *et al.*, 1995b) y en trucha arcoiris se obtienen porcentajes de fecundación altos hasta 70 Unidades Térmicas Acumuladas (UTA) después de la ovulación, lo que implica cerca de 7 días si se cultiva a 10 °C. Luego de este tiempo, las ovas se sobremaduran y su capacidad de ser fecundadas es baja.

En cautiverio, las especies salmonídeas son capaces de alcanzar la madurez sexual hasta la ovulación, pero no de realizar la puesta (Piper *et al.*, 1982). Por esta razón, la extracción de los gametos se debe realizar en forma artificial mediante masaje abdominal (trucha arcoiris), inyección de aire (salmón del Atlántico) o incisión abdominal en salmones del Pacífico.

Regularmente, durante el desove a los especímenes se les realiza una biopsia «screening» (Fig. 8) de algún órgano interno (frecuentemente riñón), semen o fluido celómico con el fin de detectar la presencia de agentes patógenos de algunas enfermedades de transmisión vertical como la enfermedad bacteriana del riñón (BKD, por sus siglas en inglés), síndrome rickettsial del salmón (SRS) o necrosis pancreática infecciosa (IPN, por sus siglas en inglés). La muestra de tejido y/o gametos de cada individuo quedan enumerados en forma correlativa, de manera que si un espécimen arroja positivo para alguna de las enfermedades detectadas, sus gametos son eliminados.

La extracción de los gametos se realiza en ambientes sin luz directa y a baja temperatura (<10 °C), utilizando ropa desechable (guantes, mascarilla, cubrecalzados, gorros y bata) con el fin de minimizar la transmisión horizontal de enfermedades (Figs. 8, 9 y 10). En trucha arcoiris y salmón plateado, el semen es extraído mediante masaje abdominal «stripping» ya que estas especies producen semen en forma abundante y de buena calidad. En el salmón Atlántico en cambio, el volumen de semen producido es bajo y se requiere utilizar una «cánula» o catéter que se introduce en la porción libre del conducto esper-



FIGURA 8.

Distintas etapas del proceso de desove en salmón Atlántico (*Salmo salar*). a: Desove por inyección de aire. b: Obtención de biopsia. c y d: Extracción de semen mediante cánula.

mático y de esta forma se obtiene semen de buena calidad y libre de contaminantes (Fig. 8). Los ovarios de los salmónidos son abiertos (Fig. 9) por lo que luego de la ovulación, los ovocitos quedan libres en la cavidad abdominal (Fig. 3b).

Los gametos son recibidos en receptáculos limpios y secos, o bien, en bolsas de plástico desechables. Ovas y semen son almacenados por un tiempo breve (1 ó 2 h) a baja temperatura ($<4^{\circ}\text{C}$) y en ausencia de luz a la espera de la fecundación (Dazarola *et al.*, 1999b). Algunas empresas mantienen sus reproductores a miles de kilómetros del sitio en el que se realizará la fecundación e incubación, por lo que los gametos suelen ser transportados hasta por 24 h a los sitios de fecundación.

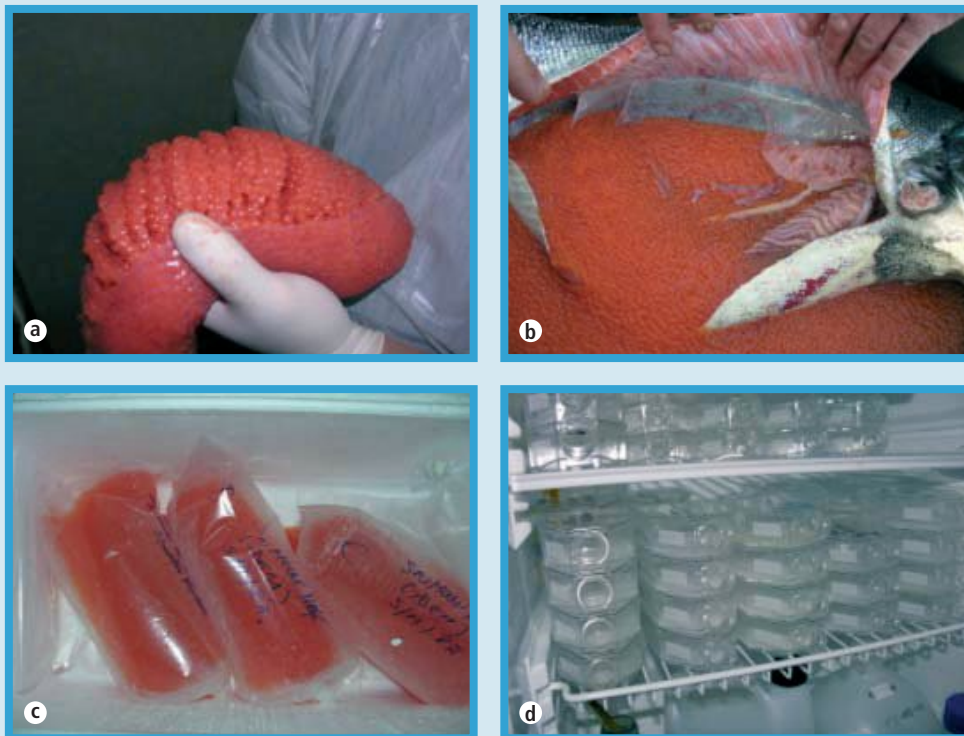


FIGURA 9.

a: Ovario gimnovárico de salmónidos en madurez máxima. b: Disposición de los oocitos en la cavidad abdominal después de la ovulación. c. Ovas de *Salmo salar* dispuestas para el traslado. d: Almacenamiento de semen a la espera del diagnóstico ictiopatóológico.

El transporte se realiza por medios terrestres, acuáticos y/o aéreos en cajas de «pluma-vit» con temperaturas de entre 2-4 °C en su interior (Fig. 9). El semen se mantiene en frascos de cultivo o receptáculos desechables y las ovas en bolsas desechables a las que se adiciona oxígeno en forma abundante (Fig. 9c y d). Las ovas se transportan acompañadas del líquido (o fluido) celómico. Para viajes muy largos, el semen es diluido en un «extender o dilutor» en una razón de 1:2. Estas soluciones son isotónicas y contienen altos niveles de potasio con el fin de mantener bloqueada la motilidad espermática (para mayor información sobre fisiología espermática en peces se recomienda revisar



trabajos de Billard, 1978; Billard, 1988; Billard, 1992; Lahnsteiner *et al.*, 1993; Perchec *et al.*, 1993; Billard *et al.*, 1995; Krise *et al.*, 1995; Rana, 1995; Cosson *et al.*, 1999). Los diluyentes espermáticos además de las sales señaladas pueden contener antibióticos, glucosa y otros componentes que permiten, además de bloquear la actividad flagelar, bajar la constante crioscópica de la solución.

Antes de la fecundación, se evalúa la calidad de los gametos. En las ovas se realiza en forma subjetiva a «ojo desnudo» detectando sobremadurez, evaluando el color de las ovas y el color y aspecto del líquido celómico. Las ovas de buena calidad se observan de color anaranjado homogéneo y poco turgente. En cambio, las sobremaduras son turgentes producto de la hidratación, de mayor tamaño y los pigmentos carotenoides se polarizan y concentran en una región de la ova (Fig. 10a y b). El líquido celómico es evaluado visualmente en relación a su aspecto y color, pero muchas empresas evalúan la concentración salina, ya que salinidades altas se registran en el líquido de ovas sobremaduras y de baja fertilidad.

La calidad del semen se evalúa también a «ojo desnudo» en función de su pureza y homogeneidad, y microscópicamente determinando el nivel de motilidad que alcanzan los espermatozoides. Regularmente, se busca aquel semen que presenta movimiento en masa, lo que significa que los espermatozoides presentan una actividad flagelar intensa y se prolonga por cerca de 50 s.

La fecundación se realiza regularmente utilizando el método seco, aunque es frecuente el uso de activadores espermáticos que reemplazan el líquido celómico (Fig. 10c), especialmente en aquellas hembras en las que éste se presenta hemorrágico o con alta salinidad. En estos casos, el líquido celómico se reemplaza por un activador espermático, estas son soluciones salinas isotónicas que prolongan y potencian la actividad flagelar del espermatozoide. En su formulación se pueden utilizar diferentes componentes como glucosa, sales (cloruro de sodio), aminoácidos (glicina), estabilizadores de pH (Tris) y metilxantinas (cafeína).

Para fecundar, si se conoce el estado sanitario de los peces, se prepara un «pool» de semen con los gametos de 4 a 6 machos cuya motilidad espermática fue evaluada como buena. De este pool, se agrega

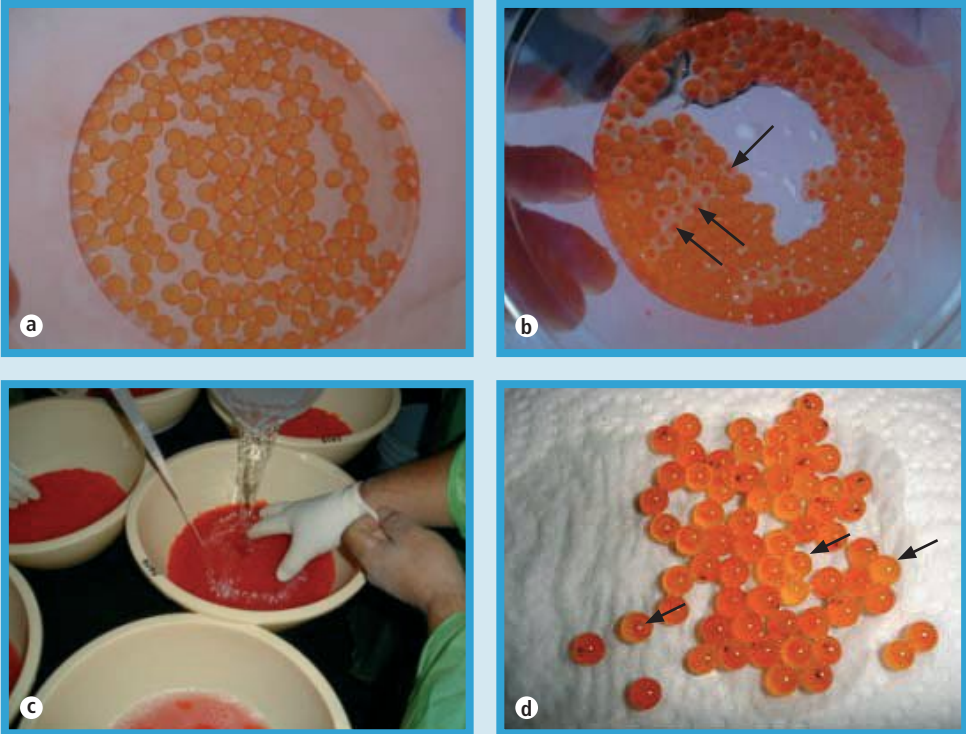


FIGURA 10.

a: Ovas de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) de aparente buena calidad, de color homogéneo y poco turgentes. b: Ovas sobremaduras de trucha arcoiris (flechas). c: Fecundación artificial de ovas de *Salmo salar* aplicando un activador espermático. d: Ovas de *Salmo salar* antes del choque mecánico para separar las ovas embrionadas de las sin fecundar (flechas).

entre 1 y 2 ml a las ovas de una hembra. Inmediatamente, se realiza la mezcla de gametos en forma manual, utilizando un guante desechable con el fin de evitar que fluidos de una hembra tomen contacto con los de otra. Si no se conoce el estado sanitario de los machos, regularmente se utiliza el semen de un macho para fecundar las ovas de hasta 10 hembras, si la biopsia indica que el macho es positivo para alguna de las enfermedades controladas, se eliminan todas las ovas que fueron fecundadas con el semen de ese macho. Frecuentemente, la mezcla



de gametos se deja reposar por 5 min y luego de esto se procede a lavarlos, utilizando agua de cultivo con la que se extrae el exceso de semen y algunos contaminantes que acompañan las ovas, como son restos de sangre, contenido intestinal y ovas reventadas. Después del lavado, las ovas se dejan reposar por cerca de una hora para producir la hidratación antes de ser introducidas en los sistemas de incubación, permanecen en estas condiciones sin manipulaciones hasta que se pigmentan los ojos de los embriones y se pueden separar de las ovas no fecundadas (Fig. 10d). Durante esta etapa se cuantifica el número de huevos por hembra midiendo el volumen total de las ovas producidas por cada espécimen. Frecuentemente, se utiliza el método de Von Bayer (Piper *et al.*, 1982; Ingram, 1986) que relaciona el diámetro de las ovas con su volumen. Usando la regla de Von Bayer se determina el número de ovas que entran en 12 pulgadas y en una planilla se puede determinar el número de ovas existentes en un litro. También se cuantifica el volumen ocupado por cien ovas con el principio de Arquímedes y luego por regla de tres simple se determina el número de ovas existentes en el volumen total de ovas producido por una hembra (Bernabé, 1991).

En salmónidos, el desarrollo embrionario ocurre en agua dulce y hasta la etapa de eclosión se requieren cerca de 370 UTA en trucha arcoiris y 510 UTA en salmón Atlántico (Edwards, 1978). Para la incubación se utiliza agua de la mayor calidad, esto implica que debe estar saturada de oxígeno, libre de sólidos en suspensión y de gases. La temperatura regularmente se debe encontrar $< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y los sistemas utilizados van desde sistemas verticales, horizontales, «zoug jar» y «combi» (Fig. 11a, b, c y d). Frecuentemente se utiliza un flujo de 1 L min^{-1} por cada 10.000 embriones (aunque esto depende de la calidad y disponibilidad de agua). Una vez alcanzado el estado de embrión de ojos pigmentados, se aplica un choque mecánico a los embriones con el fin de eliminar los embriones débiles u ovocitos sin fecundar (Fig. 10d), los que se tornan blancos y opacos, fácilmente diferenciables de los embriones vivos que son transparentes y anaranjados. Con esta diferenciación, en forma manual o utilizando una seleccionadora, se pueden separar y cuantificar los embriones vivos de los muertos. Las mortalidades obtenidas en esta etapa, aunque en ocasiones muy variables, se encuentran cercanas al 30 %.



FIGURA 11.

Sistemas de incubación utilizados en especies salmonídeas.

a: Combi. b. Zoug jar. c: Vertical. d: Horizontal.

En Chile, es común que se prolongue el tiempo del periodo de incubación bajando la temperatura en que ocurre el desarrollo embrionario. Esto se logra comenzando el desarrollo con temperaturas óptimas (8-10 °C), pero luego de iniciado el desarrollo se baja la temperatura a cerca de 2 °C con agua recirculada, pudiendo retardar la eclosión por varios meses y contar de esta manera con grupos desfásados para la etapa de crecimiento (Bromage y Cumaranatunga, 1988 y Bromage, 1988).

La larvicultura se prolonga por cerca de 150 UTA en trucha arcoiris y 290 UTA en salmón Atlántico. La temperatura del agua en esta etapa se encuentra entre 12 y 14 °C y se realiza en ausencia de luz hasta el suminis-



tro de alimento exógeno. Regularmente, se utiliza una tasa de renovación del 100 % h^{-1} . En salmón del Atlántico se debe utilizar sustratos naturales o artificiales que reducen el gasto energético permitiendo un mayor destino de energía a la formación de tejidos y además, minimizan los efectos de la marcada conducta gregaria que presentan las larvas en esta especie.

Cuando a las larvas les queda un 20 ó 10 % de remanente del saco vitelino se inicia la primera alimentación, utilizando una dieta de arranque con partículas de aprox. 300 μm y altos niveles de proteína. Regularmente, el alimento se suministra *ad libitum* intentando alcanzar la saciedad y con fotoperiodos de 24 h de luz, pudiendo de esta manera, alimentar las 24 h del día. Desde la eclosión a la primera alimentación se obtienen mortalidades cercanas al 5 %.

En todas las especies salmonídeas, el sexo de mayor rendimiento productivo es el femenino por su madurez tardía, mejor crecimiento, mayor retención de pigmentos carotenoides y mejor supervivencia. Por esto, las poblaciones monosexo «todas hembras» son producidas con frecuencia en la producción industrial de truchas y cada vez más en salmón del Atlántico. Esta producción se realiza utilizando el método indirecto, es decir, producir la reversión fenotípica del sexo de una hembra hacia macho (regularmente denominada «neomacho» (Fig. 12a) cuyo genotipo es XX). Esto se logra suministrando en el inicio de la alimentación exógena, alimento que contiene 2 - 3mg de metiltestosterona por kilogramo de alimento por un periodo de 2 a 3 meses. Con este tratamiento, se logra revertir la expresión fenotípica del sexo de un alto porcentaje de las hembras. Estos especímenes, después de al menos dos años alcanzarán su pubertad y el ovario gimnovárico (sin conducto) se transformará en un testículo que carece de conducto deferente (Fig. 12ba) (Ingram, 1986), por lo que es incapaz de liberar el semen (regularmente denominado «semen femenino» porque sólo contiene espermatozoides con el cromosoma X), por lo que debe ser sacrificado para extraer su «semen». Esto se realiza macerando el testículo en una solución inhibidora de la motilidad espermática en la cual se liberarán los espermatozoides maduros (sin activar su motilidad), los que son acompañados por células inmaduras de la línea germinal y restos de otros tejidos. Frecuentemente, el semen se diluye en una relación de una parte



de semen por dos de diluyente espermático y luego es utilizado en forma similar al semen de un macho normal.

Frecuentemente, en la producción de truchas esta técnica es complementada con la triploidización por medio de choques térmicos (después de 30 min de la fecundación a una temperatura de 28 °C por un tiempo de 10 min) o de presión (después de 30 min de la fecundación a una presión de $6-8 \times 10^4$ kPa por un tiempo de 4 min). Con estos tratamientos se alcanzan porcentajes de triploidía cercanos al 90 % y con altas supervivencias. En salmónidos, los especímenes triploides adultos se caracterizan por ser estériles (Fig. 12c). Las hembras no desarrollan gónada y permanecen durante toda su vida con aspecto de un individuo pre-puber (sin caracteres sexuales secundarios), lo que mejora su rendimiento productivo ya que se mantienen con un IGS menor a 1 y no sufren pérdidas en su pigmentación muscular (Fig. 12d), principal criterio para su comercialización en los mercados internacionales. Los machos en cambio, aunque estériles, desarrollan un testículo que puede alcanzar un IGS cercano a 4 y producen semen aneuploide (Fig. 12e y f). Debido a lo anterior, los caracteres sexuales secundarios se expresan en forma similar a un macho normal y sufren la pérdida de color muscular que impide su comercialización después de iniciada la madurez sexual.

Entonces, si se triploidizan ovas «todas hembras» obtenidas de la fecundación de ovas de una hembra normal (XX) con el semen de un «neomacho» («XX»), se obtendrá una descendencia formada sólo por hembras. Si por efecto de la triploidía se obtienen especímenes estériles y sin desarrollo gonadal, el rendimiento productivo de estas cohortes es un 20 % mayor que el de una población normal.

10.2.10. Comentarios y recomendaciones

Los investigadores del área de cultivo de peces debemos realizar un esfuerzo mayor en publicar nuestros resultados en revistas indexadas que faciliten el acceso a la información y además, sea científicamente válida, ya que en la actualidad la información se encuentra muy dispersa en manuales técnicos, informes de proyectos, tesis, páginas web, entres otros. Estos no siempre se encuentran disponibles en forma expedita y además, algunos de ellos no cuentan con el respaldo científico que fundamente los resultados en ellos señalados.

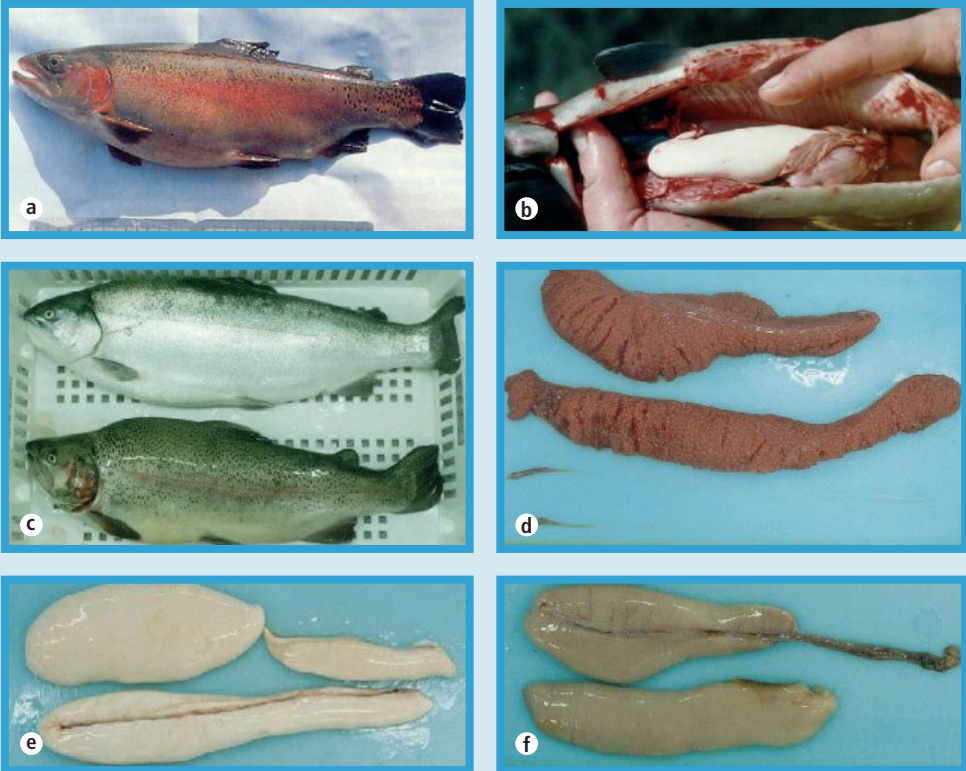


FIGURA 12.

a: Características externas de un «neomacho» sexualmente maduro de trucha arcoiris. b: Desarrollo testicular (sin conducto) de un neomacho de trucha arcoiris. c: Características externas de una hembra (superior) y macho (inferior) triploides de trucha arcoiris después de dos años de cultivo. d: Desarrollo gonadal de una hembra normal diploide (2n) (superior) y triploide (3n) (inferior). e. Aspecto macroscópico de los testículos de un macho normal de trucha arcoiris y f: de un macho triploide.

Por otra parte, los piscicultores de Latinoamérica, han adquirido experiencia con alguna de las especies introducidas y que en la actualidad registran los mayores niveles de producción (salmónidos, tilapias y/o carpas) y que han llegado a nuestra región «para quedarse». El desarrollo de estas capacidades, se ha transformado en la base para el desarrollo de tecnologías que permitan el cultivo de especies nativas, de alta calidad y demanda en los mercados. Con seguridad no



serán «todas cultivadas», pero un buen número de ellas aparecen con grandes perspectivas o su cultivo se encuentra cercano a una realidad productiva de grandes dimensiones, como es el caso de los Colosomas, Cichlasomas, Piaractus y Odontheistes. Para esto, se requiere de recursos provenientes de los gobiernos o de las empresas que en la actualidad desarrollan «jugosos» negocios con especies introducidas, pero que también podrían generar actividades comerciales de buena rentabilidad con las especies nativas de nuestra región. Con esto, no sólo se protegerán sus inversiones, sino también el patrimonio genético, cultural y ambiental de Latinoamérica.

10.3. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Margarita Kiewek-Martínez por colaborar en la búsqueda de información y en la edición del documento, al igual que a Roberto Lagos por su colaboración en la recopilación de bibliografía. A Juan Pablo Lazo, Araceli Avilés, Lilly Carrera, Alfonso Silva, Tomas Cabrera y Juan Felipe Sierra por contribuir amablemente con información general de sus respectivas investigaciones y bibliografía. Para la parte de peces de agua dulce agradecemos la colaboración de Gustavo Wicki de Argentina por la importante información facilitada respecto del cultivo de pacú y la lectura de los borradores. A Daniel Meyer de Honduras por sus aportes sobre tilapias. A Beatriz Ángeles de Perú por la información facilitada sobre la acuicultura de su país. A Lisette Cabezas y Gabriel Osses, alumnos de la carrera de Acuicultura de la Universidad Católica de Temuco.

BIBLIOGRAFÍA

- ABREU, P., R. ROBALDO, L. SAMPAIO, C. ODEBRECHT, and A. BIANCHINI, 2003 Recurrent Amyloodinosis in cultured Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*: Dinospores monitoring and new measures of prophylaxis. World aquaculture 2003. Salvador, Brazil. «Realizing the potencial: Responsible aquaculture for a secure future». Book of abstracts vol. 1. May 19-23. Bahia convention center, Salvador, Brazil.
- AGER, L. A., D. E. HAMMOND, and F. WARE, 1978 Artificial Spawning of Snook. Proceedings of the Annual Conference Southeastern Association of Game and Fish Commissioners 30: 158-166.



- ALCÁNTAR-VÁZQUEZ, P., H. SKYOL-PLIEGO, S. DUMAS, M. ROSALES-VELÁZQUEZ, and P. PINTOS, 2003 Evaluación del efecto del análogo del factor de liberación de la hormona luteinizante (LHRH-a) sobre el desove de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Pisces:Serranidae). VIII Congreso Nacional de Ictiología.
- ÁLVAREZ-LAJONCHERE, L. S., V. R. CERQUEIRA, and M. REIS, 2002a Desarrollo embrionario y primeros estadios larvales del robalo chucumite, *Centropomus parallelus* Poey (Pisces, Centropomidae) con interés para su cultivo. Hidrobiológica 12(2): 89-100.
- ÁLVAREZ-LAJONCHERE, L. S., V. R. CERQUEIRA, I. D. SILVA, J. ARAÚJO, and M. A. D. REIS, 2002b Mass production of juveniles of the fat snook *Centropomus parallelus* in Brazil. J. World Aquacul. Soc. 33(4): 506-516.
- ÁLVAREZ-LAJONCHERE, L. S., V. R. CERQUEIRA, I. D. SILVA, J. ARAÚJO, and M. A. D. REIS, 2004 First basis for a sustained juvenile production technology of fat snook *Centropomus parallelus* Poey. Hidrobiológica 14(1): 37-45.
- ALVES, T., V. R. CERQUEIRA, and J. BROWN, 2006 Early weaning of fat snook (*Centropomus parallelus*, Poey, 1864) larvae. Aquaculture 253: 334-342.
- ÁNGELES, B. and J. MENDO, 2005 Crecimiento, fecundidad y diferenciación sexual del lenguado *Paralichthys adspersus* (Steindechner) de la costa central del Perú. Ecología aplicada 4(1-2): 105-112.
- Aquanoticias, 1998 Acuicultura en Chile: más allá de los salmones. Aquanoticias 10(45): 33-73.
- ARNOLD, C. R., J. L. LASSWELL, W. H. BAILEY, T. D. WILLIAMS and W. A. FABLE JR., 1976 Methods and techniques for spawning and rearing spotted seatrout in laboratory. Proceedings Annual Meeting SE Association Fish Wildlife Agency 30: 167-178.
- AVILÉS-QUEVEDO, A., U. MCGREGOR-PARDO, R. RODRIGUEZ-RAMOS, O. HIRALES-COSIO, M. A. HUERTA-BELLO, and M. IZAWA, 1995 Biología y cultivo de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868). Subsecretaría de Pesca/INP/JICA (eds.) 85 p.
- AVILÉS-QUEVEDO, A., R. RODRÍGUEZ-RAMOS, U. MCGREGOR-PARDO, and M. IZAWA, 1996a Indices de la condición de una población de *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868) silvestre y en cautiverio en Bahía Falsa, Baja California Sur, México. 0-025, Resúmenes XI Simposium Internacional de Biología Marina. La Paz, B.C.S., México 18-22 de nov. de 1996.
- AVILÉS-QUEVEDO, A., U. MCGREGOR-PARDO, R. RODRÍGUEZ-RAMOS, and M. IZAWA, 1996b Desove y producción de huevos de cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner, 1868) en condiciones de cautiverio. 0-082, Resúmenes XI Simposium Internacional de Biología Marina. La Paz, B.C.S., México 18-22 de noviembre 1996.



- AVILÉS-QUEVEDO, A., R. RODRÍGUEZ-RAMOS, U. MCGREGOR-PARDO, and M. IZAWA, 1998 Descripción del huevo y larva temprana del pargo amarillo, *Lutjanus argentiventris*. Seminario Interamericano Reproducción y Cultivo de Peces Marinos y Dulceacuícolas, Inst. Nac. Pesca, México City, March. In: Tucker W. J. 1998. Marine Fish Culture. Kluwer Academic Publishers. Boston. 750 pp.
- AVILÉS-QUEVEDO, A., 2002 Estado actual y desafíos de la piscicultura marina en México. En Reunión nacional sobre cultivo de peces marinos editado por Hernández-Martínez. 23-24 de mayo de 2002, Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, Baja California Sur.
- AVILÉS-QUEVEDO, A., 2005 Calidad de huevos y larvas según el manejo de los reproductores de la cabrilla (*Paralabrax maculatofasciatus*, Pisces: Serranidae). Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona. 187p.
- BANKS, M. A., G. J. HOLT, and J. M. WAKEMAN, 1991 Age-linked changes in salinity tolerance of larval spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*, Cuvier). J. Fish Biol. 39: 505-514.
- BARILE, J., A. BÓRQUEZ, I. VALDEBENITO, F.J. QUEVEDO, I. SALGADO, A. MARDONES, R. VEGA, and P. DANTAGNAN, 2003 Antecedentes para el cultivo del puye *Galaxias maculatus* (Pisces: Galaxiidae). ISBN 956-291-870-X. Gráfica Sur Ltda. Temuco-Chile: 144pp.
- BARNABÉ, G., 1991 Acuicultura II. Omega, Barcelona. 1099 pp.
- BARRÓN-VIVANCO, B., N. J. DUNCAN, N. GARCÍA-AGUILAR, J. GUTIÉRREZ, and A. GARCÍA-GASCA, 2005 Effect of LHRHa on the expression of stress-related molecules in the ovary of wild caught *Sphaeroides annulatus* held in captivity. J. Fish Biol. 67: 582-588.
- BECHARA, J. A., M. E. VARELA, J. P. ROUX, C. A. LONGONI DE MEABE, and F. RUIZ-DÍAZ, 2000 Alimentación natural del Pacú (*Piaractus mesopotamicus*) en sistemas semi-intensivos: importancia relativa del suplemento alimenticio, el tiempo de engorde y la calidad del agua. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes Argentina. 4 pp.
- BENETTI, D. D., C. A. ACOSTA, and J. C. AYALA, 1995 Cage and pond aquaculture of marine finfish in Ecuador. World Aquaculture 26(4): 7-13.
- BENETTI, D. D., 1997 Spawning and larval husbandry of flounder (*Paralichthys woolmani*) and Pacific yellowtail (*Seriola mazatlanensis*), new candidate species for aquaculture. Aquaculture 155: 307-318.
- BERNARDINO, G. and V. A. FERRARI, 1989 Efeitos do uso de racao comercial no desempenho do pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 em cativeiro. Boletim Técnico do CEPTA 2 (N.º único): 19-34.



- BILLARD, R., 1978 Changes in structure and fertilizing ability of marine and freshwater fish spermatozoa diluted in media of various salinities. *Aquaculture* 14: 187-198.
- BILLARD, R., 1988 Artificial insemination and gamete management in fish. *Marine Behavior Physiology* 14: 3-21.
- BILLARD, R., 1992 Reproduction in Rainbow Trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture* 100: 263-298.
- BILLARD, R., J. COSSON, L. W. CRIM, and M. SUQUET, 1995 Sperm physiology and quality, pp. 25-52 in *Broodstock management and egg and larval quality* edited by N. Bromage and R. Roberts Blackwell Science, Stirling.
- BLACIO, E., J. DARQUEA, and S. RODRÍGUEZ, 2002 Avances en el cultivo de huayaipe, *Seriola rivoliana* (valeciennes 1833), en las instalaciones del CENAIM. *El mundo acuícola* 9(1): 23-24.
- BLACIO, E., 2005 Cultivo de huayaipe (*Seriola rivoliana*) en piscinas de tierra y piscinas cubiertas con geomembrana. CENAIM informa, Boletín informativo 123.
- BLANCO, M. C., 1995 La trucha, cría industrial. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 503 pp.
- BORTONE, S. A. and J. L. WILLIAMS, 1986 Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (South Florida). Gray, lane, mutton and yellowtail snappers. U.S. Fish Willdlife Service of Biol. Rep. 82(11.52), 18 pp.
- BOTERO, M., A. FRESNEDA, A. MONTOYA, and M. OLIVERA, 2004 Descripción del desarrollo embrionario de cigotos híbridos obtenidos por el cruce de machos de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y hembras de cachama negra (*Colosoma macropomum*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 17: 38-45.
- BROMAGE, N., 1988 Propagation and stock improvement, pp 103-153 in *Intensive Fish Farming* edited by C. J., Shepherd and N., Bromage. BSP Professional Books, Oxford.
- BROMAGE, N. and R. CUMARANATUNGA, 1988 Egg production in the Rainbow Trout, pp 63-169 In *Recent Advances in Aquaculture Volume 3* edited by J. Muir and R. Roberts. University Press, Cambridge.
- BROMAGE, N., PORTER, M. and C. RANDALL, 2001 The environmental regulation of maturation in farmed finfish with special reference to the role of photoperiod and melatonin. *Aquaculture* 197: 63-98.
- BUMGUARDNER, B. W., R. L. COLURA, A. HENDERSON-ARAZAPALO, and A. F. MACIOROWSKI, 1992 Culture of Spotted Seatrout, Orange Corvina, and their hybrids. *California Fish and Game* 78: 105-115.



- CABRERA, T., J. ROSAS, and J. MILLÁN, 1997a Some aspects about the reproduction and larval rearing of captive mangrove snapper *Lutjanus griseus* L. EAS convention. Martinique.
- CABRERA, T., J. ROSAS, and J. MILLÁN, 1997b Reproducción y desarrollo larvario del pargo dentón (*Lutjanus griseus*, L. 1758) (Pisces: Lutjanidae) cultivado en cautiverio. Caribb. J. Sci. 33(3-4): 239-245.
- CABRERA, T., G. LEONARDI, J. ROSAS, and J. MILLÁN, 1999 Culture of the mangrove snapper *Lutjanus griseus*. 31st World Aquaculture Society Conference. Sydney, Australia.
- CABRERA, T., D. BENETTI, D. JORY, J. ROSAS, P. LÓPEZ, J. LEÓN J. MILLÁN, and L. LEÓN, 2000a Avances en el cultivo de pargos (Lutjanidae) y perspectivas para la producción comercial. III Congreso Latinoamericano de Acuicultura, Panamá.
- CABRERA, T., J. ROSAS, J. LEÓN, J. MILLAN, D. JORY, and L. LEÓN, 2000b Advances in the culture of the mangrove snapper *Lutjanus griseus*. Aquaculture America 2000. New Orleans, USA.
- CADDELL, S. M., D. M. GADOMSKI, and L.R. ABBOTT, 1990 Induced spawning of the California Halibut, *Paralichthys californicus*, (Pises: Paralichthyidae) under artificial and natural conditions. Fish. bull. 174: 175-197.
- CASTILLO, L., 2006 Tilapia roja 2006. Una evolución de 25 años, de la incertidumbre al éxito. 124pp. <http://ag.arizona.edu/azaqua/ista/Colombia/TILA-PIAROJA2006.pdf>
- CERQUEIRA, V. R., R. MIOSO, J. A. G. MACCHIAVELLO, and A. M. BRÜGGER, 1997 Induced spawning of the Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus* Valenciennes, 1839). Boletín del Instituto de Pesca 24(especial): 247-254.
- CERQUEIRA, V. R., 2002 Cultivo do robalo, pp. 94 in Cultivo do robalo: aspectos da reprodução, larvicultura e engorda (ed. by R.V. Cerqueira), Universidad Federal de Santa Catarina, Laboratorio de Piscicultura Marina, Florianópolis, Brasil.
- CERQUEIRA, V. R., 2005 Egg development of *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839). Braz. arch. biol. techn. 48(3): 459-465.
- CERVANTES-TRUJANO, M., G. E. MERINO, J. B. MUGUET, E. GISBERT, D. E. BUSH, R. H. PIEDRAHITA, and D. E. CONKLIN, 2002 Avances en el cultivo del Lenguado de California, *Paralichthys californicus*. Panorama Acuicola 8(1): 40-41.
- CERVIGÓN, F., 1993 Los peces marinos de Venezuela. Volume 2. Fundación Científica Los Roques, Caracas, Venezuela.
- CHINCHAYÁN, M., G. VERA, R. CISNEROS, and L. CARRERA, 1997 Notas sobre el cultivo de los Lenguados *Paralichthys adspersus* y *Eropus ectenes* en ambiente controlado. Informe Prog. Instituto del Mar de Perú 64: 34-51.
- CLARKE, M. E., M. L. DOMEINER, and W. A. LAROCHE, 1997 Development of larvae and juveniles of the Mutton Snapper (*Lutjanus analis*), Lane Snapper (*Lut-*



- janus synagris*) an Yellowtail Snapper (*Lutjanus chrysurus*). B. Mar. Sci. 61: 511-537.
- COLLINS, M. R., J. H. FINUCATE, and L. E. BARGER, 1980 Description of larval and juvenile Red Snapper, *Lutjanus campechanus*. Fish. Bull. 77: 965-974.
- COLPOS, 2007 Cultivo del Bagre de Canal (*Ictalurus punctatus*) en jaulas flotantes. Manual del participante. Disponible en http://www.sra.gob.mx/internet/informacion_general/programas/fondo.
- COLURA, R. L., 1974 Induced spawning of the spotted Seatrout, *Cynoscion nebulosus*, (Cuvier). Proceedings of the World Mariculture Society 5: 319-330.
- COLURA, R. L., 1990 Saltwater pond fertilization. Texas A&M Sea Grant TAMU-SG-90-603.
- COLURA, R. L., A. HENDERSON-ARAZAPALO, and A. F. MACIOROWSKI, 1991 Culture of Red Drum, pp. 149-166 in Handbook of mariculture, Vol. II, Finfish Aquaculture, edited by J. P. Mcvey. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- COSER, A. and H. GODINHO, 1987 Capacidade de fertilizacao de ovocitos e semen de curimata pacu (*Prochylodus marggravii*) em condicoes experimentais. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciencia, 39.^a Brasilia, DF: 884.
- COSSON, J., R. BILLARD, CH. CIBERT, C. DREANNO, and M. SUQUET, 1999 Ionic factors regulating the motility of fish sperm. 44pp. <http://biodev.obs-vlfr.fr/publications>.
- DANTAGNAN, P., A. BÓRQUEZ, J. QUEVEDO, and I. VALDEBENITO, 2002 Cultivo larvario del Puye (*Galaxias maculatus*), en un sistema cerrado de recirculación. Información Tecnológica 13(2): 15-22.
- DANTAGNAN, H., A.S. BÓRQUEZ, I. VALDEBENITO, I. SALGADO, E. SERRANO, and M. IZQUIERDO, 2007 Lipid and fatty acid composition during embryo and larval development of Puye *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842), obtained from estuarine, freshwater and cultured populations. J. Fish Biol. 70: 770-781.
- DAVIS, D. A. and C. R. ARNOLD, 1997 Response of Atlantic Croaker fingerlings to practical diet formulations with varying protein and energy contents. Journal of the World Aquaculture Society 28: 241-248.
- DAZAROLA, G., N. DÍAZ, and G. YANY, 1999a Manejo de fotoperiodo e inducción de la ovulación en salmónidos. TECIA Tecnología de Innovación en Acuicultura. Impresora Milano, Viña del Mar-Chile.
- DAZAROLA, G., N. DÍAZ, G. YANY, R. NEIRA, and R. MANTEROLA, 1999b Conservación y criopreservación de semen en salmónidos. TECIA Tecnología de Innovación en Acuicultura. Impresora Milano, Viña del Mar-Chile.
- DETLAFF, T.A., A.S. GINSBURG, and O. I. SCHMALHAUSEN, 1993 Sturgeon fishes. Development biology and aquaculture. Springer-Verlag. Berlin.



- DÍAZ, R. J. and C.P. ONUF, 1985 Habitat suitability index models: juvenile Atlantic croaker (rev.). U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep. 82(10.98), pp. 23 in Tucker W. J. 1998. Marine Fish Culture. Kluwer Academic Publishers. Boston.
- DRAWBRIDGE, M., 2001 Marine finfish farming in California. Current status and techniques for farming white Seabass *Atractoscion nobilis*. Aquaculture 2001: Book of Abstracts. 194 p. 2001.
- DUMAS, S., J. L. ORTIZ-GALINDO, R. I. OCHOA-BAEZ, J. R. TORRES-VILLEGAS, M. O. ROSALES-VELASQUEZ, J. A. OCAMPO-CERVANTES, D. E. HERNÁNDEZ-CEBALLOS, V. GRACIA-LÓPEZ, T. GRAYEB-DEL ALAMO, C. A. ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, and A. PÉREZ-MORALES, 2001 Control of gonadal maturation in laboratory and hormonal induced spawning of the Pacific red snapper *Lutjanus peru* Nicholls and Murphy. Aquaculture 2001: Book of Abstracts. 195 p. 2001.
- DUMAS, S., M. O. ROSALES-VELAZQUEZ, M. CONTRERAS-OLGUI, D. HERNANDEZ-CEBALLOS, and N. SILVERBERG, 2004 Gonadal maturation in captivity and hormone-induced spawning of the Pacific Red Snapper *Lutjanus peru*. Aquaculture 234(1-4): 615-623.
- DUNCAN, N. J., M. RODRIGUEZ G. A. DE O., D. ALOK, and Y. ZOHAR 2003 Effects of controlled delivery and acute injections of LHRHa on Bullseye Puffer fish (*Sphoeroides annulatus*) spawning. Aquaculture 218: 625-635.
- DUPREE, H., 1995 Channel catfish (*Ictalurus punctatus*), pp. 220-241 in Broodstock management and egg and larval quality. Bromage, N.R. and Roberts, R.J. (Eds). Blackwell Science, Cambridge.
- EDWARDS, D., 1978 Salmon and Trout farming in Norway. Fishing News Books Limited, G.B.
- EDWARDS, R. E. and B. D. HENDERSON, 1987 An experimental hatchery project: Studies of propagation, culture and biology of Snook (*Centropomus undecimalis*). Proceedings 38th Annual Meeting of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute 38: 211-221.
- ESCHMEYER, W.N., E.S. HERALD, and H. HAMMANN, 1983 A field guide to Pacific coast fishes of North America. Houghton Mifflin Company, Boston, U.S.A.
- ESTAY, F., N. DÍAZ, R. NEIRA, and X. GARCÍA, 1995a Reproductive performance of cultured female Coho Salmon in Chile. The Progressive Fish Culturist 59: 36-40.
- ESTAY, F., N. DÍAZ, L. VALLADARES, and G. DAZAROLA, 1995b Manejo reproductivo de salmónidos. Bases biológicas y manejo de un stock de peces reproductores. Serie de Publicaciones para la Acuicultura N.º 2. Publicado gracias al aporte del proyecto «Manejos reproductivos aplicados a la producción de salmónidos», CONICYT-FONDEF, realizado entre 1993-1996. 61 pp.



- ESTAY, F., C. VERGARA, and N. DÍAZ, 1999 Reproductive performance of cultures Atlantic Salmon *Salmo salar* L. 1758 in Chile. Aquac. Res. 10: 759-764.
- EUFRACIO, P. and A. PALOMINO, 2006 Manual de cultivo de gamitana. FONDEPES, AECI y PADESPA. Gobierno del Perú.
- FABLE, W. A., JR., T. D. WILLIAMS, and C. R. ARNOLD, 1978 Description of reared eggs and young larvae of Spotted Seatrout, *Cynoscion nebulosus*. Fish. Bull. 76: 65-71.
- FAO, 2003 Revisión del estado mundial de la Acuicultura. FAO Circular de Pesca FIRI/C886(Rev. 2), Roma.103pp.
- FAO, 2004 Fisheries Statistics, Aquaculture. Global Aquaculture Production 1950-2004.
- FONDEPES, 2006 Policultivo de peces tropicales en la amazonía peruana. Guía Técnica. FONDEPES. Gobierno del Perú.
- FRESNEDA, A., G. LENIS, E. AGUDELO, and M. OLIVERA, 2004 Espermiación inducida y crioconservación de semen de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 17: 46-52.
- FUJITA, S. and T. YOGATA, 1984 Induction of ovarian maturation, embryonic development and larvae and juveniles of the Amberjack, *Seriola aureovittata*. Japan Journal of Ichthyology 30: 426-434.
- GARCIA, A., M. V. DIAZ, and B. AGULLEIRO, 2001 Hormonal Induction of spawning and embryonic development of Mediterranean Yellowtail (*Seriola dumerili*, Risso). Serie Monografías Del ICCM. 4: 561-566.
- GARCÍA-GASCA, A., M. A. GALAVIZ, J. N. GUTIÉRREZ, and A. GARCÍA-ORTEGA, 2006 Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the Bullseye Puffer fish *Sphoeroides annulatus*. Aquaculture 251: 366-376.
- GARCÍA-ORTEGA, A., I. ABDO, and C. HERNÁNDEZ, 2003 Weaning of Bullseye Puffer (*Sphoeroides annulatus*) from live food to microparticulate diets made with decapsulated cysts of Artemia and fishmeal. Aquacul. Int. 11: 183-194.
- GARZA, G., W. H. BAILEY, and J. L. LASSWELL, 1978 Rearing of Black Drum in fresh water. Progressive Fish Culturist 40(4): 1-170.
- GISBERT, E., G. MERINO, J. B. MUGUET, D. BUSH, R. H. PIEDRAHITA, and D. E. CONKLIN, 2002 Morphological development and allometric growth patterns in hatchery-reared California halibut larvae. J. Fish Biol. 61: 1217-1229.
- GISBERT, E., R. H. PIEDRAHITA, and D. E. CONKLIN, 2004a Ontogenetic development of the digestive system in California Halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. Aquaculture 232: 455-470.



- GISBERT, E., D. B. CONKLIN, and R. H. PIEDRAHITA, 2004b Effects of delayed first feeding on the nutritional condition and mortality of California halibut larvae. *J. Fish Biol.* 64: 116-132.
- GJERDE, B., 1993 Breeding and selection, pp. 187-208 in *Salmon Aquaculture* edited by K. Heen, R., Monahan and F., Utter. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- GORDON, M. R., K. C. KLOTINS, V. M. CAMPBELL, and M. M. COOPER, 1987 Farmed Salmon broodstock management. Ministry of Environment Victoria, B.C. Canada, Industrial Research Assistance Program National Research council of Canada, Aquafarms, Ltd. Vancouver, B.C. and B.C. Research Vancouver, B.C.
- GRACIA-LÓPEZ, V., T. GARCÍA-GALANO, G. GAXIOLA-CORTÉS, and J. PACHECO-CAMPOS, 2003 Effect of dietary protein level and commercial feeds on growth and feeding of juvenile common Snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1792). *Cienc. Mar.* 29(4B): 585-594.
- GRACIA-LÓPEZ, V., J. RODRÍGUEZ-ROMERO, and J. M. PÉREZ-RAMÍREZ, 2004a Hormone induced spawning (HCG), and embryonic and larval development of the Leopard Grouper *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). *Cienc. Mar.* 30(2): 279-284.
- GRACIA-LÓPEZ, V., M. KIEWEK-MARTÍNEZ, and M. MALDONADO-GARCÍA, 2004b Effects of temperature and salinity on artificially reproduced eggs and larvae of Leopard Grouper *Mycteroperca rosacea*. *Aquaculture* 237(1-4): 485-498.
- GRACIA-LÓPEZ, V., M. KIEWEK-MARTÍNEZ, M. MALDONADO-GARCÍA, P. MONSALVO-SPENCER, G. PORTILLO-CLARK, R. CIVERA-CERECEDO, M. LINARES-ARANDA, M. ROBLES-MUNGARAY, and J. M. MAZÓN-SUÁSTEGUI, 2005 Larvae and juvenile production of the Leopard Grouper, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). *Aquac. Res.* 36(1): 110-112.
- GRACIA-LOPEZ, V., C. ROSAS VAZQUEZ, and R. BRITO, 2006 Effects of salinity on physiological conditions in juvenile common Snook *Centropomus undecimalis*. *Comp. Biochem. Phys. A* 145(3): 340-345.
- GRACIA-LÓPEZ, V., M. KIEWEK, M. MALDONADO, P. MONSALVO, G. PORTILLO, R. CIVERA, M. LINARES, M. ROBLES, J. M. MAZÓN, J. SANDOVAL, M. OSUNA, P. ORMART, J. M. PÉREZ, J. RODRÍGUEZ, y M. CARRILLO, 2006 Avances en la investigación y producción de la Cabrilla Sardinera, *Mycteroperca rosacea*. Cartel. «Primera Conferencia Latino Americana sobre Cultivo de Peces Nativos» Morelia, Michoacán, Mexico.
- GRIER, H. J. and R. G. TAYLOR, 1998 Testicular maturation and regression in the Common Snook. *J. Fish Biol.* 53: 521-542.



- GRIER, H., 2000 Ovarian germinal epithelium and folliculogenesis in the common Snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei: Centropomidae). J. Morphol. 243: 265-281.
- GWO, J. C., K. STRAWN, M. T. LONGNECKER, and C. R. ARNOLD, 1991 Cryopreservation of Atlantic Croaker spermatozoa. Aquaculture 94(4): 355-375.
- HEARN, R., 1996 Researchers take critical step in protecting, producing Red Snappers. Aquaculture Magazine 22(6): 6-9.
- HENDERSON-ARAZAPALO, A., 1990 Red Drum egg and larval incubation, pp. 51-52 in Marine Fish Culture, edited by W. J. Tucker 1998. Kluwer Academic Publishers. Boston.
- HENDERSON-ARAZAPALO, A., R. L. COLURA, and A. F. MACIOROWSKI, 1994 A comparison of Black Drum, Red Drum, and their hybrid in saltwater pond culture. Journal of the World Aquaculture Society 25: 289-296.
- HENDERSON-ARAZAPALO, A., 1995 Review of nursery and growout culture techniques for Red Drum (*Scianeps ocellatus*), pp. 67-79 in Culture High-Value Marine Fishes in Asia and the United States, edited by K. L. Main, and C. Rosenfeld. Oceanic Institute, Honolulu.
- HERNÁNDEZ, A., 1992 Estado actual del cultivo de *Colossoma* y *Piaractus* en Brasil, Colombia, Panamá, Perú y Venezuela. Red Regional de Acuicultura 6(3-4): 3-27.
- HOLT, G. J. and C. R. ARNOLD, 1983 Effects of ammonia and nitrite growth and survival of Red Drum eggs and larvae. T. Am. Fish. Soc. 112: 314-318.
- HOLT, G. J., 1990 Growth and development of Red Drum eggs and larvae, pp. 46-50 in Red drum aquaculture edited by G. W. Chamberlain, R. J. Miget and M. G. Haby. Texas A&M University Sea grant TAMU-SG-90-603.
- HOLT, G. J., C. R. ARNOLD, and C. M. RILEY 1990 Intensive culture of larval and post larval Red Drum, pp. 53-56 in Marine Fish Culture, edited by W. J. Tucker 1998. Kluwer Academic Publishers. Boston.
- HONTELA, A. and N. STACEY, 1990 Cyprinidae, pp. 53-72 in Reproductive Seasonality in Teleosts: Environmental Influences edited by A., Munro, A., Scott, and T.J. Lam. CRC Press, Boca Ratón-Florida.
- HUET, M., 1998 Tratado de piscicultura. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- INGRAM, M., 1986 Ova and Milt, High technology broodstock management. Clearwater Publishing Limited. Isle of Man, British Isles.
- JEREZ, S., M. SAMPER, F. J. SANTAMARIA, J. E. VILLAMANDOS, J. R. CEJAS, and B. C. FELIPE, 2006 Natural spawning of Greater Amberjack (*Seriola dumerili*) kept in captivity in the Canary Islands. Aquaculture 252(2-4): 199-207.



- JOHNSON, G. D., 1978 Development of fishes of the Mid-Atlantic Bight: An Atlas of egg, Larval and juveniles Stage, Vol. 4. U.S. Fish Wildlife Service 314 p.
- JORY, D., T. CABRERA, B. POLANCO, J. MILLÁN, J. ROSAS, E. GARCÍA, R. SÁNCHEZ, M. USECHE, R. AGUDO, and C. ALCESTER, 1999 Aquaculture in Venezuela: Currents status and perspectives. *World Aquaculture* 30(3): 20-70.
- KIEWEK-MARTÍNEZ, N. M., 2004 Contribución al conocimiento de la reproducción en cautiverio de la Cabrilla Sardinera, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México.
- KIEWEK-MARTÍNEZ, M. and V. GRACÍA-LÓPEZ, 2004 Hormone induced breeding of the Leopard grouper *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1977) held in captivity. International 5th Symposium on Fish Endocrinology, September 5-9, 2004. Castellón, Spain.
- KIEWEK-MARTÍNEZ, M., V. GRACÍA-LÓPEZ, S. ZANUY., M. CARRILLO, J. SANDOVAL, and S. IBÁÑEZ, 2006 Ciclo reproductivo de la Cabrilla Sardinera, *Mycteroperca rosacea* en cautiverio con base a su desarrollo gonadal y el nivel de esteroides sexuales. «Primera Conferencia Latino Americana sobre Cultivo de Peces Nativos». Morelia, Michoacán, Mexico.
- KOMAR, C., J. F. TURNBULL, A. ROQUE, E. FAJER, and N. J. DUNCAN, 2004 Effect of water treatment and aeration on the percentage hatch of demersal, adhesive eggs of the Bullseye Puffer (*Sphoeroides annulatus*). *Aquaculture* 229: 147-158.
- KRIEGER-AZZOLINI, M. H., J. CAROLSFELD, E. DELATTRE, P. S. CECCARELLI, and F. V. MENEZES, 1989 Determinacao dos indicadores endocrinos e metabólicos no estresse de manejo em pacu juvenil, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. *Boletim Técnico do CEPTA*, 2(Nº único): 35-42.
- KRISE, W., M. HENDRIX, W. BONNEY, and S. BAKER-GORDON, 1995 Evaluation of sperm-activating solutions in Atlantic Salmon *Salmo salar* fertilization tests. *Journal of the World Aquaculture Society* 26(4): 384-389.
- KURONAMA, K. and K. FUKUSHO, 1984 Rearing of marine fish larvae in Japan, pp. 109 in *Marine Fish Culture* edited by W. J., Tucker 1998. Kluwer Academic Publishers. Boston.
- LAHNSTEINER, F., R. A. PATZNER, and T. WEISMANN, 1993 Energy resources of spermatozoa of the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* (Pisces, Teleostei). *Reproduction Nutrition Development* 33: 349-360.
- LAIDLEY, C. W. and A. C. OSTROWSKI, 2001 Final oocyte maturation, spawning and embryonic development of Red Snapper *Lutjanus campechanus*. *Aquaculture* 2001: Book of Abstracts. 343 pp.



- LANKFORD, T. E. JR. and T. E. TARGETT, 1994 Suitability of estuarine nursery zones for juvenile weakfish (*Cynoscion regalis*): effects of temperature and salinity on feeding, growth and survival. *Mar. Biol.* 119: 611-620.
- LÓPEZ, E., V. GRACIA, C. DE OÑA, M. SAENZ DE RODRIGÁNEZ, F. J. ALARCÓN, and M. DÍAZ, 2005 Estudio histológico del desarrollo del sistema digestivo de la Cabrilla Sardinera, *Mycteroperca rosacea* (Streets, 1877). X Congreso Nacional de Acuicultura. Valencia, España. Octubre 2005.
- LUCHINI, L., 1990 Revisión y compilación sobre técnicas de reproducción inducida. *Boletín Red Regional de Acuicultura* 4(1): 3-8.
- MACINTOSH, D. J. and D. C. LITTLE, 1995 Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*), pp. 277-320 in *Broodstock management and egg and larval quality* edited by N. Bromage and R. Roberts. Blackwell Science, Stirling.
- MACIOROWSKI, A. F., A. HENDERSON-ARZAPALO, D. E. ROBERTS JR., R. L. COLURA and C. E. MC CARTY, 1987 Fingerlings production of Common Snook, *Centropomus undecimalis*, in saltwater ponds. *Proceedings 38th Annual Meeting of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 38: 190-202.
- MACNAIR, L. S., M. L. DOMEIER, and C. S. Y. CHUN, 2001 Age, growth, and mortality of California Halibut, *Paralichthys californicus*, along southern and central California. *Fish. Bull.* 99: 588-600.
- MAIR, G. and T. ABELLA, 1997 Technoguide on the production of genetically male Tilapia (GMT). Published by the Freshwater Aquaculture Center, Central Luzon State University, Cabanatuan City, Philippines.
- MALDONADO-GARCÍA, M., 2004 Estudio de la biología reproductiva del Robalo Paleta *Centropomus medius* (Günther, a. 1864) para su aplicación en acuicultura. Tesis doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S., México.
- MALDONADO-GARCÍA, M., V. GRACIA-LÓPEZ, M. CARRILLO, A. HERNÁNDEZ-HERRERA, and C. RODRÍGUEZ-JARAMILLO, 2005 Stages of gonad development during the reproductive cycle of the Blackfin Snook, *Centropomus medius* Günther. *Aquac. Res.* 36: 554-563.
- MARINO, G., A. MANDICH, A. MASSARI, F. ANDALORO, S. PORRELLO, M. G. FINOIA, and F. CEVASCO, 1995 Aspects of reproductive biology of the Mediterranean Amberjack (*Seriola dumerilii*, Risso) during the spawning period. *J. Appl. Ichthyol.* 11(1-2): 9-24.
- MARTÍNEZ-LAGOS, R. A., 2003 Maduración y desove del Pargo Amarillo *Lutjanus argentiventris* (Peters, 1869) en condiciones controladas de temperatura y fotoperíodo. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. Tesis de maestría. 118 pp.



- MASUMA, S., M. KANEMATU, and K. TERUYA, 1990 Embryonic and morphological development of larvae and juveniles of the Amberjack, *Seriola dumerili*. Japanese Journal of Ichthyology 37: 164-169.
- MERCER, L. P., 1984 A biological and fisheries profile of Spotted Seatrout, *Cynoscion nebulosus*. North Carolina Department of Natural Resources Special Sci. Rep. No. 40, 87 p.
- MIDDAUGH, D. P. and R. L. YOAKUM, 1974 The use of chorionic gonadotropin to induce laboratory spawning of the Atlantic Croaker, *Micropogonias undulates*, with notes on subsequent embryonic development. Chesapeake Science 15: 110-114.
- MORAN, D., 1988 Species profiles: Life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Gulf of Mexico). Red snapper. National Wetlands Research Cent., Slidell, LA (USA).
- MOSER, H. G., D. A. AMBROSE, M. S. BUSBY, J. L. BUTLER, E. M. SANDKNOP, B. Y. SUMIDA, and E. G. STEVENS, 1983 Description of early stages of white Seabass, *Atractoscion nobilis*, with notes on distribution. California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations. Reports 24: 182-193.
- MUNRO, A. D., 1990 Tropical freshwater fish, pp. 147-214 in Reproductive seasonality in teleosts: Environmental influences edited by A. D., Munro, A. P., Scott and T. J., Lam. CRC Press. Boca Ratón, Florida.
- MYLONAS, C. C. and Y. ZOHAR, 2001 Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. Fish Biology and Fisheries 10: 463-491.
- NACA, 1989 Integrated fish farming in China. NACA Technical Manual 7. A World Food Day Publication of the Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.
- NAVARRO, O., Y. VELASCO, and P. CRUZ, 2004 Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachipomus*). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 17(Suplemento): 53-59.
- NEILL, W. H., 1990 Environmental requirements of red drum. Texas A&M Univ. Sea Grant TAMU-SG-90-603, p 105-108.
- NIELAND, D. L. and C. A. WILSON, 1993 Reproductive biology and annual variation of reproductive variables of black drum in the northern Gulf of México. T. Am. Fish. Soc. 122: 318-327.
- ODA, D. L., R. J. LAVENBERG, and J. M. ROUNDS, 1993 Reproductive biology of three California species of *Paralabrax* (Pisces:Serranidae). CalCOFI Rep 34:122-132.
- ORHUM, M. R., 1989 Early Life History of White Sea Bass *Atractoscion nobilis*. M.S. Thesis, San Diego State Univ., California, 162 p.



- PAPANDROULAKIS, N., C. C. MYLONAS, E. MAINGOT, and P. DIVANACH, 2005 First results of Greater Amberjack (*Seriola dumerili*) larval rearing in mesocosm. *Aquaculture* 250(1-2): 155-161.
- PAPANIKOS, N., R. PHELPS, K. WILLIAMS, A. FERRY, and D. MAUS, 2001 Egg and larval quality of natural and induced spawns of Red Snapper, *Lutjanus campechanus*. *Fish Physiol. Biochem.* 28(1-4): 487-488.
- PERCHEC, P., J., COSSON, F. ANDRÉ, and R. BILLARD, 1993 La motilité des spermatozoïdes de Truite (*Oncorhynchus mykiss*) et de Carpe (*Cyprinus carpio*). *J. Appl. Ichthyol.* 9: 129-149.
- PÉREZ-MELLADO, J., 1993 Inducción al desove de la Cabrilla Arenera *Paralabrax maculatofasciatus*. Informe int. ITMAR-Guaymas, Son., Mex. 23p.
- PÉREZ-PINZÓN, M. A. and P. L. LUTZ, 1991 Activity related cost of osmoregulation in the juvenile snook, *Centropomus undecimalis*. *B. Mar. Sci.* 48: 58-66.
- PETERS, K. M., R. E. JR. MATHESON, and R. G. TAYLOR, 1998 Reproduction and early life history of common Snook *Centropomus undecimalis* (Bloch) in Florida. *B. Mar. Sci.* 62: 509-529.
- PETERSON, M. S. and R. G. JR. GILMORE, 1991 Eco-physiology of juvenile Snook *Centropomus undecimalis* (Bloch): Life-history implications. *Bulletin of Marine Science* 48: 46-57.
- PINEDA, H., 2004 Estudio genético de las Cachamas (subfamilia Serrasalminae) en poblaciones naturales y en cautiverio en Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 17(Suplemento): 62-63.
- PINEDA, H., L. RESTREPO, and M. OLIVERA, 2004 Comparación morfométrica entre machos y hembras de Cachama Negra (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) mantenidos en estanques. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 17(Suplemento): 24-29.
- PIPER, R., I. McELWAIN, L. ORME, J. MCCRAREN, L. FOWLER, and J. LEONARD, 1982 Fish hatchery management. American Fisheries Society and Fish and Wildlife Service. Washington.
- POHL-BRANSCHIED, M. and W. HOLTZ, 1990 Control of spawning activity in male and female Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) by repeated foreshortened seasonal light cycles. *Aquaculture* 86: 93-104.
- POORTENAAR, C. W., S. H. HOOKER, and N. SHARP, 2001 Assessment of Yellowtail Kingfish (*Seriola lalandi lalandi*) reproductive physiology, as a basis for aquaculture development. *Aquaculture* 201(3-4): 271-286.
- PRENTICE, J. A., R. L. COLURA, and B. W. BOMGUARNER, 1989 Observations on induced maturation and spawning of Orangemouth Corvina. *Calif. Fish Game* 75: 27-32.



- PROCARIONE, L. S. and T. L. KING, 1993 Upper and lower temperature tolerance limits for juveniles Red Drums from Texas and South Carolina. *J. Aquat. Anim. Health* 5: 208-212.
- PULLELA, S., 1997 Aquaculture of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and a comparison of its quality: microbiological, sensory and proximate composition. Thesis submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Food Science and Technology. 191pp.
- RABALAIS, N. N., S. C. RABALAIS, and C. R. ARNOLD, 1980 Description of eggs and larvae of laboratory reared Red Snapper (*Lutjanus campechanus*). *Copeia* 1980: 704-708.
- RANA, K., 1988 Reproductive biology and the hatchery rearing of Tilapia eggs and fry, pp. 343-406 in *Recent Advances in Aquaculture. Volume 3.* edited by J. Muir and R. Roberts. University Press, Cambridge.
- RANA, K., 1995 Preservation of gametes, pp. 53-75 in *Broodstock management and egg and larval quality* edited by N. Bromage and R. Roberts. Blackwell Science, Stirling.
- REARTES, J. L., 1995 El Pejerrey (*Odontesthes bonariensis*): métodos de cría y cultivo masivo. FAO-COPESCAL, Documento Ocasional N° 9: 35pp.
- REBAZA, C., E. VILLAFANA, M. REBAZA, and S. DEZA, 2002 Influencia de tres densidades de siembra en el crecimiento de *Piaractus brachypomus*. «Paco» en segunda fase de alevinaje en estanques seminaturales. *Folia Amazónica* 13(1-2): 121-134.
- REMEDIOS, L., 2002 La Acuicultura en pequeños embalses en América Latina y el Caribe. FAO, Organización de las Naciones Unidas para Agricultura y la Alimentación. Roma, 2002:25pp. <http://www.red-arpe.cl/document/Pape-rRemedios.pdf>
- RILEY, C. M., G. J. HOLT, and ARNOLD, C. R., 1995 Growth and morphology of larval and juvenile captive bred Yellowtail Snapper *Ocyurus chrysurus*. *Fish. Bull.* 93: 179-1985.
- RINGUELET, R., 1943 Piscicultura del pejerrey o aterinicultura. Colección Agro. Editorial Suelo Argetino, Bs. As.
- ROBERTS, D. E. JR., 1987 Induced maturation and spawning of common Snook, *Centropomus undecimalis*. *Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute* 38: 222-230.
- ROBERTS, D. E. JR., 1990 Photoperiod/Temperature control in commercial production of Red Drum (*Scianeps ocellatus*) eggs. *Texas A&M Univ. Sea Grant TAMU-SG-90-603*, p 35-43.



- RODRÍGUEZ, A. and G. H. DOMKE, 2006 Caracterización de la alimentación endógena en cautiverio y en ambiente natural para larvas tempranas de Puye (*Galaxias maculatus*, Jenyns, 1842). Una comparación. Revista Aquatic 24: 50-53.
- ROSALES-VELÁSQUEZ, M. O., R. MARTÍNEZ-PECERO, B. ANGUAS-VÉLEZ, M. CONTRERAS-OLGUIN, and E. O. RODRÍGUEZ-MORALES, 1992 Inducción al desove de la Cabrilla Arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Steindachner) (Pisces:Serranidae) mantenida en el laboratorio. III Congreso Nacional de Ictiología. Oaxtepec, Mor., Mex. 18.
- ROSAS, J. C., T. B. CABRERA, and J. Q. MILLAN, 1998 Application of two types of hormones in the artificial reproduction of the Mangrove Snapper, *Lutjanus griseus*. Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute 50: 543-550.
- ROTTMAN, F. J., D. D. BENETTI, E. DEMICCO, and M. R. ORHUN, 2005 Larval rearing of Spotted Seatrout, *Cynoscion nebulosus* (Sciaenidae), using probiotics as microbial control agent. Journal of Aquaculture in the Tropics 20(2): 175-184.
- SAAVEDRA, E. 2007 Reproducción y alevinaje del Pirarucú *Arapaima gigas* (Cuvier, 1817). Disponible en http://www.iiap.org.pe/publicaciones/CDs/ME-MORIAS_VALIDAS/pdf/
- SAAVEDRA, E. and L. G. QUINTEROS, 2007 Producción controlada del Pirarucú *Arapaima gigas* (Cuvier, 1817). Disponible en http://www.iiap.org.pe/publicaciones/CDs/MEMORIAS_VALIDAS
- SAMPAIO, L. A. and A. BIANCHINI, 2002 Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 269: 187-196.
- SANTAMARÍA-MIRANDA, A., J. ELORDUY-GARAY, M. VILLALEJO-FUERTE, and A. A. ROJAS-HERRERA, 2003 Gonads development and reproductive cycle of *Lutjanus peru* (Pisces: Lutjanidae) of the Guerrero coast, Mexico. Rev. Biol. Trop. 51(2): 489-502.
- SAUCIER, M. H. and D. M. BALTZ, 1993 Spawning site selection by Spotted Seatrout *Cynoscion nebulosus* and Black Drum *Pogonias cromis*, in Luisiana. Environ. Biol. Fish. 36: 257-272.
- SCOTT, A. P., 1990 Salmonids, pp 33-51 in Reproductive Seasonal in Teleosts: Environmental Influences edited by A. D., Munro, A. P., Scott and T. J., Lam. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida.
- SILVA, A., 1990 Experiencias sobre la inducción al desove del lenguado (*Paralichthys microps*, Gunther 1881) con la hormona GCH. Boletín Red Regional de Acuicultura 4(1): 8-10.
- SILVA, A., 1996 Conditioning and spawning of the flounder, *Paralichthys microps*, Gunther, 1881, in captivity. Proceedings of a workshop on fish and Mollusc larviculture, 97-102.



- SILVA, A. and A. VELEZ, 1998 Development and challenges of turbot and flounder aquaculture in Chile. *World Aquaculture* 29(4): 48-51.
- SILVA, A., 1999 Effect of microalga (*Isochrysis galbana*) in the early larval culture of *Paralichthys adspersus*. *Cienc. Mar.* 25(2): 267-276.
- SILVA, A., 2001 Advance in the culture research on small-eye flounder *Paralichthys microps* and Chilean Flounder *Paralichthys adspersus* in Chile. *Journal of Applied Aquaculture* 11(1/2): 147-164.
- SILVA, A., M. OLIVA, and F. CASTELLÓ, 2001 Evaluación del crecimiento de juveniles de lenguado chileno (*Paralichthys adspersus*, Steindachner, 1867) cultivado en estanques. *Biología Pesquera* 29: 21-30.
- STICKNEY, R., 1993 Channel catfish, chapter 2 in *Culture of nonsalmonid freshwater fishes*. Stickney, R. (Ed). CRC Press, Boca de Ratón: 33-80.
- SZEDLMAYER, S. T., 1987 Hormone-Induced Spawning of Weakfish. *The Progressive Fish-Culturist* 49: 158-160.
- TANIGUCHI, A. K., 1981 Survival and Growth of larval spotted (*Cynoscion nebulosus*) in relation to temperature, prey abundance and stocking densities. *Rapp. P. V. Réun.Cons. Int. Explor. Mer* 178: 507-508.
- TAYLOR, R. G., H. J. GRIER, and J. A. WHITTINGTON, 1998 Spawning rhythms of Common Snook in Florida. *J. Fish Biol.* 53: 502-520.
- TAYLOR, R.G., J. A. WHITTINGTON, H. J. GRIER, and R. E. CRABTREE, 2000 Age, growth, maturation and protandric sex reversal in Common Snook, *Centropomus undecimalis*, from the east and west coast of South Florida. *Fisheries Bulletin* 98: 612-624.
- TEMPLE, S., V. R. CERQUEIRA, and J. BROWN, 2004 The effects of lowering prey density on the growth, survival and foraging behaviour of larval Fat Snook (*Centropomus parallelus* Poey 1860). *Aquaculture* 233: 205-217.
- THOMAS, P. and N. BOYD, 1988 Induced spawning of Spotted Seatrout, Red Drum and Orangemouth Corvine (Family Sciaenidae) with Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Analogue injection. *Contributions in Marine Science* 30: 43-47.
- THOMAS, P. and N. BOYD, 1989 Dietary administration of LHRH analogue induces spawning of Spotted Seatrout, (*Cynoscion nebulosus*). *Aquaculture* 80: 363-370.
- THOMSON, D. A., L. T. FINDLEY, and A. N. KERSTITCH, 1987 Reef fishes of the Sea of Cortez. University of Arizona Press. U.S.A.
- THRESHER, R. E., 1984 Reproduction in reef Fishes. T.F.H. Neptune City, New Jersey.
- 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. and B. E. FAULKNER, 1987 Voluntary spawning patterns of captive Spotted Seatrout (*Cynoscion nebulosus*). Northeast Gulf Science 9: 59-63.
- TUCKER, J. W. JR., 1988 Growth of juvenile Spotted Seatrout on dry feeds. Progressive Fish-Culturist 50: 39-41.
- TUCKER, J. W. JR., W. A. LELLIS, G. K. VERMEER, D. E. ROBERTS, JR. and P. N. WOODWARD, 1997 Growth of Red Drum, *Scianeps ocellatus*, to maturity on experimental diets. Journal of Applied Aquaculture 7: 93-108.
- TUCKER, W. J., 1998 Marine Fish Culture. Kluwer Academic Publishers. Boston.
- VALDEBENITO, I., 2003 Estudio de los parámetros reproductivos del puye (*Galaxias maculatus*, Jenyns, 1842) (OSMERIFORMES: GALAXIIDAE) bajo condiciones de cultivo experimental en el Sur de Chile. Memoria para optar al grado de Doctor en Cs. del Mar de la Universidad de Las Palmas de Gran Canarias, España. 211 pp.
- WAKEMAN, J. M. and D. E. WOHLSCHLAG, 1977 Salinity stress and swimming performance of Spotted Seatrout. Proceedings of the Annual Conference SE. Association of Fish Wildlife Agency 31: 357-361.
- WATANABE, W. O., E. P. ELLIS, S. C. ELLIS, J. CHAVEZ, C. MANFREDI, R. W. HAGOOD, M. SPARSIS, and S. ARNESO, 1998 Artificial propagation of Mutton Snapper *Lutjanus analis*, a new candidate marine fish species for aquaculture. J. World Aquacult. Soc. 29: 176-187.
- WHITEHURST, A. and H. R. ROBINETTE, 1994 Tolerance of juvenile red drum *Scianeps ocellatus* to rapidly decreasing water temperatures. J. World Aquacult. Soc. 25: 225-229.
- WICKI, G., 1987 Cultivo y producción de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) incidencia de dos dietas de diferente composición y de la densidad de siembra, en sistema de cultivo semi-intensivo. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias área Acuicultura de la Escuela para Graduados Alberto Soriano-Universidad de Buenos Aires. 97pp.
- WINFIELD, I. and J. NELSON, 1991 Cyprinid fishes, systematics, biology and exploitation. Chapman and Hall, London.
- WISE, D. J., C. R. WEIRICH, and J. R. TOMASSO, 1989 Toxicity of ammonia to Red Drum *Scianeps ocellatus* fingerlings with information on uptake and depuration. J. World Aquacult. Soc. 20: 188-192.
- WOYNAROVICH, A. and E. WOYNAROVICH, 1998 Reproducción artificial de las especies *Colossoma* y *Piaractus*. Guía detallada para la reproducción de alevinos de Gamitana, Paco y Caraña. FONDEPES. Lima, Perú.
- WOYNAROVICH, E. and L. HORVÁTH, 1981 Propagación artificial de peces de aguas templadas: manual para extensionistas. FAO, Documento Técnico de Pesca 201: 187 pp.



- YUTO, J. A., M. SANDOVAL, F. CHU-KOO, P. PADILLA, and L. MORI, 2006 Tasa de alimentación en juveniles de paiche *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829) criados en cautiverio. 24. Resúmenes de exposiciones del 2º Congreso Nacional de Acuicultura. Universidad Nacional Agraria la Molina, La Molina-Lima, Perú. Noviembre de 2006:24.
- ZACARIAS-SOTO, M., J. B. MUGUET, and J. P. LAZO, 2006 Proteolytic activity in California Halibut larvae (*Paralichthys californicus*). J. World Aquacult. Soc. 37(2): 175-185.
- ZANUY, S. and M. CARRILLO, 1987 La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura, pp 1-131 en Reproducción en Acuicultura editado por J. Espinosa de los Monteros y U. Labarta. Industrias Gráficas de España, Madrid.
- ZOHAR, Y. and C. MYLONAS, 2001 Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. Aquaculture 197: 99-136.