

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Efecto de la inyección de un análogo de GnRH sobre la maduración final ovocitaria y los perfiles plasmáticos de esteroides gonadales en anchoveta peruana (*Engraulis ringens*)

Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en Hidrobiología y Pesquería

AUTOR:

Paola Bianca Cisneros Linares

LIMA – PERÚ 2007

A mi familia, por todo

Para empezar quiero agradecer a mis asesores, Carlos Espinoza, por todos los conocimientos impartidos durante el tiempo que tomo realizar este trabajo, por haber confiado en mi apoyándome de una manera incondicional, por su paciencia y dedicación y Martha Valdivia, por sus sugerencias y que a pesar de su agenda recargada siempre estuvo apoyándome guiándome.

A Betsy Buitrón, por ayudarme con las lecturas histológicas y a Ángel Perea, por sus aportes y comentarios a bordo.

A las personas del laboratorio de Biología Experimental y Biología Reproductiva, Víctor, Christian, Enrique, Pablo, Carmela, Liz, Karina, Javier y Cecilia porque de alguna u otra forma siempre estuvieron apoyándome.

A la Dra. Denise Vizziano, por abrirme las puertas de su laboratorio en la Universidad de la Republica para realizar los RIA, y al Dr. Carlos Martínez, por brindarme las facilidades durante mi estancia en dicha universidad. A Andrés Alberro y Magdalena Mateo, por la detalla y exhaustiva explicación en los ensayos de RIA.

A mis amigas de la facultad, Kelly, Giannina, Vanessa y Ángela, que estuvieron conmigo desde el inicio y que seguro lo estarán hasta el final.

Al señor Tapia de la Universidad de Concepción y Kalen Su de la Universidad Católica del Norte, por ayudarme con la recopilación y envío de información que necesite para armar este trabajo de tesis.

Al Instituto del Mar del Perú por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo de tesis en el Laboratorio de Biología Experimental.

A Dios, por haberme permitido culminar este trabajo, pero principalmente a mi familia, a mis padres Sergio y Ada y mis hermanas Adita y Andreita, que estuvieron conmigo en todo momento, sin su ayuda, sobre todo en los momentos más complicados, no lo hubiera logrado.

Eternamente agradecida

Paola

INDICE

1. INTRODUCCIÓN

2. ANTECEDENTES

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Obtención de peces y su acondicionamiento en cautiverio

3.2 Inyección de Hormonas

3.3 Extracción de las gónadas y análisis histológico

3.4 Determinación de Hormonas Esteroideas en plasma

3.5 Análisis de datos

3.6 Análisis Estadístico

4. RESULTADOS

4.1 Efecto del GnRHa sobre la maduración final ovocitaria.

4.2 Efecto del GnRHa sobre los niveles plasmáticos de hormonas esteroideas.

4.3 Niveles plasmáticos de T, E2 y 17 β , 20 DP durante el proceso de maduración final, desove y post desove en hembras de *E. ringens* inyectadas con GnRHa.

5. DISCUSIÓN

5.1 Efecto del GnRHa sobre la maduración final ovocitaria.

5.2 Efecto del GnRHa sobre los niveles plasmáticos de hormonas esteroideas

5.3 Niveles plasmáticos de T, E2 y 17 β , 20 DP durante el proceso de maduración final, desove y post desove en hembras de *E. ringens* inyectadas con GnRHa.

6. CONCLUSIONES

7. RECOMENDACIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXO

TABLAS

FIGURAS

FOTOS

GLOSARIO

RESUMEN

Se determinó el efecto de un análogo de GnRH sobre la maduración final ovocitaria y los perfiles plasmáticos de testosterona (T), 17β Estradiol (E2) y 17α , 20β dihidroxiprogesterona (17α , 20β DP) en ejemplares de *E. ringens*. Para ello, individuos de esta especie fueron capturados en la Bahía del Callao fueron acondicionados al cautiverio en tanques de 10 m^3 con aeración constante, temperatura del agua de $16\text{ }^\circ\text{C}$, recirculación de agua de mar y alimentación *ad libitum* durante un periodo de un mes. Una vez que los peces alcanzaron la madurez gonadal, fueron tomados al azar y anestesiados con triclaína (80 mg L^{-1}) para luego inyectarles $0,005\text{ }\mu\text{g GnRHa g}^{-1}$ de peso corporal; $0,005\text{ }\mu\text{g GnRHa g}^{-1}$ de peso corporal + $0,01\text{ mg DOM g}^{-1}$ de peso corporal y $0,9\%$ de solución salina. Como GnRHa se empleo acetato de buserelina y como antidopaminérgico se empleó domperidona. Transcurridas 0, 12, 24 y 48 h post inyección (pi) grupos de peces fueron sacrificados mediante sobre exposición de triclaína con la finalidad de extraer las gónadas y coleccionar la sangre en tubos Eppendorf. El efecto de la hormona sobre la maduración final ovocitaria fue determinado en base al análisis histológico de las gónadas, mientras que su efecto sobre los perfiles de los esteroides mencionados se determinó en base a la cuantificación plasmática mediante radioinmunoanálisis.

Los resultados sugieren que la inyección de acetato de buserelina a $0,005\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ de peso corporal induce la maduración final ovocitaria en hembras maduras de *E. ringens* 12 horas pi, culminando con el desove entre las 24 y 48 horas pi. Por otro lado, la combinación de esta hormona con domperidona tendría un efecto retardante sobre la activación de dicho proceso. Se determinó además, que los niveles plasmáticos de E2 disminuyen durante la maduración final ovocitaria y luego de producirse el desove se incrementan. Finalmente, se sugiere que el 17α , 20β DP podría estar implicado en la activación de la maduración final ovocitaria sin llegar a ser el principal MIS de la anchoveta.

ABSTRACT

The present work had a main objective determine the effect of an analogue of GnRHa on the final oocyte maturation and on the hormonal profiles of testosterone (T), 17β Estradiol (E2) and $17\alpha, 20\beta$ dihydroprogesterone ($17\alpha, 20\beta$ DP) in Peruvian anchovy *Engraulis ringens*. Individuals of this species were captured in Callao Bay, conditioned in 10 m^3 tanks with constant aeration, water temperature of $16\text{ }^\circ\text{C}$, recirculation of seawater and fed *ad libitum* for a period of one month. Once fish reached gonadal maturity they were taken at random and anesthetized with Tricaine (80 mg L^{-1}), and injected with $0,005\text{ }\mu\text{g GnRHa g}^{-1}\text{ BW}$; $0,005\text{ }\mu\text{g GnRHa g}^{-1}\text{ BW} + 0,01\text{ mg DOM g}^{-1}\text{ BW}$ and 0,9% of saline solution. Busereline acetate was used as GnRHa and domperidone as antidopaminergic. After 0, 12, 24 and 48 h post injection (pi) groups of fish were sacrificed by means of over exposition of tricaine with the purpose to extract the gonads and to collect the blood in Eppendorf tubes. The effect of the hormone on the final maturation was determined based on histological analysis of the gonads, while its effect on the steroids hormones profiles was determined based on plasmatic quantification using RIA.

These results suggest that busereline acetate injection of $0,005\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ body weight has an inductor effect on final oocyte maturation in mature females of *E. ringens* 12 hours pi, ending with spawning between 24 and 48 hours pi. In the other hand, the combination of this hormone with domperidone could have a delaying effect on the activation of this process. Also, it was determined that plasmatic levels of E2 during the final oocyte maturation decrease and then increase after spawning. Finally, it is suggested that $17\alpha, 20\beta$ DP could be implicated in the activation of final oocyte maturation without ending up being main MIS of the anchovy

1. INTRODUCCIÓN

Los notables cambios presentados en la biomasa, “stock” desovante y reclutamiento de las poblaciones de peces hacen que los modelos de evaluación, tanto conceptuales como numéricos, sean cada vez más complejos (Pauly & Palomares, 1989); por ello, fuentes de datos, complementarias a los provenientes de estudios en campo serían de gran apoyo.

En el Perú, la pesquería está sustentada principalmente por la anchoveta peruana *Engraulis ringens*, por lo que la evaluación de los niveles poblacionales de esta especie además de la determinación de sus características biológico-pesqueras son conocimientos de gran interés.

Experimentos en laboratorio permitirían ajustar ciertos parámetros pesqueros, tales como frecuencia de desove, edad de folículos post ovulatorios, o proporcionar datos que no pueden ser obtenidos del medio natural a fin de permitir la mejor comprensión de procesos biológicos. En ese sentido, el control de la reproducción en cautiverio de la anchoveta peruana, se muestra como una necesidad para disponer de material biológico en pruebas experimentales *a posteriori*.

Debido a las complicaciones presentadas en la reproducción de peces en cautiverio que dificultan la maduración gonadal o inhiben el desove (García, 1995), el uso de hormonas exógenas resulta ser un método práctico frente a esta problemática (Patiño, 1997). La inducción de la maduración final y desove de peces en cautiverio es un tema que se viene desarrollando desde la década de 1930, principalmente con fines piscícolas en peces de agua dulce (Peter *et al.*, 1988; Godinho & Godinho, 1986) y en algunos peces marinos como salmones y róbalo (Rottmann *et al.*, 1991).

Inducciones en la anchoveta empleando hormonas exógenas permitirá comprender el proceso de maduración final y desove el cual podrá permitir a futuro evaluar el estado

reproductivo de la especie no solo a nivel histológico sino también a nivel hormonal. Además permitirá validar o ajustar parámetros reproductivos necesarios para el cálculo de la biomasa desovante, tal como edades de folículos post ovulatorios (Santander, 1984).

El presente trabajo determinó el efecto de un análogo de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH α) sobre la maduración final ovocitaria y los perfiles hormonales plasmáticos de Testosterona, 17 β Estradiol y 17 α , 20 β dihidroxiprogesterona en *E. ringens* así como también estableció la relación entre los niveles plasmáticos de T, E2 y 17 α , 20 β DP durante el proceso de maduración final, desove y post desove con la finalidad de comprender el proceso de maduración final ovocitaria y desove.

2. ANTECEDENTES

La manipulación del control ambiental para reproducir peces silvestres en cautiverio es factible en pocas especies (Suquet *et al.*, 2005), por ello, el uso de métodos químicos resulta ser una alternativa ante esta problemática (Patiño, 1997). Dichos métodos están basados en el mecanismo secuencial hipotálamo-hipófisis-gónada, mecanismo que puede ser controlado en cada uno de sus tres niveles, inhibiendo o promoviendo respuestas en el proceso reproductivo (García, 1995).

Desde la década de 1930 hasta mediados de 1970 se desarrollaron técnicas de hipofisación (García, 1995), las que siguen siendo usadas hasta la actualidad (Adebayo & Fagbenro, 2004). Estas técnicas se basan en inyectar CPE (extracto de pituitaria de carpa), SPE (extracto de pituitaria de salmón) y/o cualquier extracto a partir de hipófisis de peces para inducir la maduración final y el desove (Leong, 1971).

Posteriormente, a mediados de 1970 se empezaron a desarrollar técnicas que estimulan la producción de gonadotrofinas endógenas por la hipófisis del pez inducido (García, 1995). Estas técnicas están basadas en el uso de hormonas liberadoras de gonadotrofinas (GnRH) de mamíferos o análogos estructurales de ellas como [D-Ala⁶, Pro⁹-NEt]-GnRH, D-Ala⁶-LHRH etilamina, desGly¹⁰-LHRH etilamida y desGly¹⁰-D-Ala⁶-LHRH etilamida.

Experimentos en laboratorio han comprobado que los GnRH análogos (GnRHa) son más efectivos que los GnRH nativos debido a la modificación en su estructura molecular, la cual evita la degradación de la hormona por acciones enzimáticas de endopeptidasas (Zohar *et al.*, 1990). Estas modificaciones consisten en la sustitución de los aminoácidos de las posiciones 5-6 y 9-10 por aminoácidos dextro rotatorio y grupo etilamina, respectivamente (Goren *et al.*, 1990).

Por otro lado, se ha demostrado que el mecanismo secuencial hipotálamo – hipófisis - gónada está regulado por sistemas de retroalimentación negativo y positivo dependiente

de estradiol (Peter & Yu, 1997) o por un control dopaminérgico dependiente de dopamina (DA) (Richard *et al.*, 1988).

La DA es un neurotransmisor que al interactuar con sus receptores D2 en las células gonadotropas de la hipófisis (Chang *et al.*, 1990) bloquea la liberación de LH, es decir obstaculiza la acción de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) (Peter & Yu, 1997). Combinaciones de antagonistas de DA como pimozide (PIM), metoclopramide (MET) o domperidona (DOM) con análogos de GnRH efectiviza la acción del GnRHa induciendo la ovulación y el desove en especies con un fuerte control dopaminérgico (Richard *et al.*, 1988).

Varios trabajos se han llevado a cabo al respecto. Brzuska y Adamek (1999) obtuvieron 100% de desoves del pez siluriforme *Silurus glanis* empleando LHRHa-etilamida y PIM en dosis de 20 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ y 10 mg Kg^{-1} , respectivamente. Sin embargo, utilizando Ovaprim [(D-Arg6, Pro9-NEt) sGnRH + DOM] en dosis de 0,33 ml Kg^{-1} obtuvieron el mismo porcentaje de desoves pero ovocitos de menor calidad. Asimismo, Tan-Fermin en 1991 empleando una combinación de 0,05 $\mu\text{g g}^{-1}$ LHRHa + 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ PIM obtuvo 100% de ovulación 16 a 20 horas post inyección en hembras de *Clarias macrocephalus* (Tan-Fermin & Emata, 1993).

Por otro lado, además de emplear extractos de hipófisis, GnRH nativos y GnRH análogos, se han empleado gonadotropinas (GtH). Estas hormonas lipoproteicas placentarias o hipofisarias que estimulan el desarrollo y actividad hormonal de las gónadas, están clasificadas según su origen.

Las gonadotropinas obtenidas de mamíferos utilizadas en la inducción de peces pueden ser hipofisarias (LH, hormona luteinizante; FSH, hormona folículo estimulante) o placentarias (HCG, gonadotropina coriónica humana; PMSG, gonadotropina sérica de yegua preñada) (García, 1995), mientras que las gonadotropinas provenientes de peces son de origen hipofisario y son la GtH-I y GtH-II, funcionalmente homólogas a la FSH y LH, respectivamente (Swanson, 1991 CIT. en Patiño, 1997; Yaron *et al.*, 2003).

En general la gonadotropina más empleada en sus diferentes denominaciones comerciales es la HCG. Leong (1971) inyectando HCG en dosis de 25, 50 y 100 UI/pez no obtuvo desoves de anchoveta del norte *Engraulis mordax*; pero utilizando combinaciones de HCG con SPE o CPE consiguió desoves 18 horas después de la segunda inyección. Pruebas preliminares en el IMARPE muestran una escasa respuesta a esta hormona por parte de *E. ringens* (comunicación personal).

Toda esta secuencia de respuestas hormonales tiene como blanco al ovocito folicular, unidad básica del ovario (Nagahama, 1987; Redding & Patiño, 1993), el cual consta de una célula germinal central (ovocito) y células somáticas (células foliculares), estas últimas diferenciadas en dos monocapas, la teca y la granulosa (Tresierra, 2002)

En las células de la teca se producen una serie de reacciones enzimáticas que pueden seguir dos rutas diferentes, según se trate de la fase de crecimiento ovocitario o de la maduración final (Figura 1). En la primera fase, la cual corresponde al crecimiento del ovocito, la progesterona luego de varias transformaciones es convertida a testosterona (T). Este andrógeno atraviesa la membrana basal y entra a las células de la granulosa donde es convertida a 17β Estradiol (E2) por acción de la P450 aromataza (P450 arom). El E2 estimula la síntesis y secreción hepática de la vitelogenina, la que es incorporada en el citoplasma del ovocito en crecimiento (Nagahama, 1987) (Figura 2).

La segunda fase, que corresponde a la maduración final ovocitaria, permite la formación de las hormonas inductoras de la maduración (MIS) como la 17α , 20β dihidroxiprogestero. Para ello, la 17α hidroxiprogestero (17P) sintetizada en las células de la teca a partir de la progesterona, atraviesa la membrana basal y entra a las células de la granulosa donde es convertida en MIS por la enzima 20β hidroxisteroide deshidrogenasa (20β -HSD) (Nagahama, 1997), reactivando la meiosis y permitiendo así la maduración final del ovocito con el consiguiente desove (Nagahama *et al.*, 1983)

Nagahama *et al.* (1983) demostraron que el MIS más efectivo en la inducción a la maduración final en *Plecoglossus altivelis*, *Oncorhynchus rhodurus*, *Salmo gairdneri* y *Carassius auratus* es el 17α , 20β dihidroxiprogestero (17α , 20β DP), aunque en algunos perciformes como *Morone* sp., *Micropogonias undulatus* se ha identificado al

17 α , 20 β , 21 trihidroxiprogestero n a (17 α , 20 β , 21 DP) como el MIS en esas especies (Mylonas *et al.*, 1998; Trant *et al.*, 1986; Trant & Thomas, 1989)

Estudios sobre los niveles circulantes de hormonas reproductivas en salmónidos (tipo sincrónico) son consideradas el perfil clásico de hormonas circulantes en peces (Yan *et al.*, 1992; Tyler *et al.*, 1991). Sin embargo, los niveles plasmáticos de estas hormonas reproductivas van a depender del tipo de desarrollo ovárico de la especie, es decir tipo sincrónico, tipo grupo sincrónico o tipo asincrónico (Barrios, 2005; Asturiano *et al.*, 2002; Rinchard *et al.*, 1993; Migaud *et al.*, 2003).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Obtención de peces y su acondicionamiento en cautiverio

Anchovetas provenientes de la Bahía del Callao fueron capturadas utilizando de sistema de red izada y atracción con luces (Foto 1), colocadas en tanques de 300L y transportadas al Laboratorio de Biología Experimental del IMARPE. Los peces fueron acondicionados al cautiverio por un período de 4 semanas en tanques de 10 m³ con temperatura del agua a 16 °C, recirculación de agua de mar, fotoperíodo de 8 horas luz / 16 oscuridad y alimentados con alimento microencapsulado el cual fue reemplazado gradualmente por alimento extruído (4,61 Kcal g⁻¹)

Transcurrida la fase de acondicionamiento, peces de tallas mayores a 14 cm fueron trasladados a tanques de 2 m³ (Foto 2) con temperatura del agua a 16 °C, recirculación de agua de mar, fotoperíodo de 8 horas luz / 16 oscuridad y alimentados *ad libitum* con alimento extruído (4,61 Kcal g⁻¹) por un periodo de dos a tres semanas hasta alcanzar su madurez gonadal (Espinoza *et al.*, 2006)

3.2 Inyección de Hormonas

Los peces fueron anestesiados con Tricaína a una concentración de 80 mg L⁻¹ durante 4 minutos y luego se les inyectó intraperitonealmente (entre la aleta pélvica y el poro genital) la hormona con y sin el antidopaminérgico, y la solución salina utilizando aguja hipodérmica N° 29 (Foto 3).

Se evaluaron 2 tratamientos hormonales los que incluyeron acetato de buserelina contenida en Conceptal® como análogo de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH_a) y DOM contenida en Netaf como antidopaminérgico. A pesar que la DOM no potencia el efecto del GnRH_a sobre el desove en *E. ringens* (Cisneros *et al.*, 2006), se incluyeron tratamientos con este antidopaminérgico para evaluar su efecto sobre la maduración final ovocitaria.

Los tratamientos fueron: 0,005 μg de GnRHa g^{-1} de peso corporal; 0,005 μg GnRHa g^{-1} de peso corporal + 0,01 mg DOM g^{-1} de peso corporal; control con solución salina al 0,9 % y control sin tratamiento alguno. Se evaluó el efecto de los tratamientos sobre los niveles plasmáticos de hormonas esteroideas y sobre la maduración final de los ovocitos a 0, 12, 24 y 48 horas post inyección (pi). Por cada tratamiento se inyectaron tandas de 5 peces hasta tener como mínimo 5 peces o como máximo 15 peces por tratamiento. El número de peces por tratamiento se estableció a partir de pruebas preliminares.

	TRATAMIENTO	DOSIS
H	GnRHa	0,005 $\mu\text{g g}^{-1}$
HD	GnRHa + Domperidona	0,005 $\mu\text{g g}^{-1}$ + 0,01 mg g^{-1}
SS	Solución Salina 0.9%	
SI	Sin inyección	

Transcurrido las 0, 12, 24 y 48 horas de pi, los peces fueron sacrificados mediante una sobre exposición en tricafina (80 mg L^{-1}) para luego proceder a la obtención de sangre y extracción de las gónadas.

3.3 Extracción de las gónadas y análisis histológico

Debido a la falta de dimorfismo sexual en los ejemplares de anchoveta, se determinó el sexo de los peces al momento que fueron extraídas las gónadas, considerando en el análisis solo las gónadas de hembras de anchoveta.

Las gónadas fueron procesadas mediante la técnica de infiltración de parafina (Humason, 1979); para lo cual se tomó una muestra de cada gónada (aproximadamente $\frac{1}{4}$ de la gónada total) para deshidratarla, aclararla e infiltrarle parafina en un procesador automático de tejidos LEICA modelo TP1020 (Foto 4). Luego que las muestras estuvieron inmersas en parafina se les colocó en moldes modelo Paraflex para ser cubiertos nuevamente con parafina y formar un bloque por muestra.

Las muestras fueron cortadas a 7 μm de espesor con un micrótomo LEICA modelo RM2125RT, montadas en láminas portaobjetos, secadas y coloreadas con hematoxilina-eosina en un coloreador automático de tejidos LEICA modelo Autostainer XL. La observación de los cortes histológicos se realizó en un microscopio óptico Nikon modelo Eclipse E400 con aumentos de 100X a 400X.

Para identificar el estadio de madurez de los ovocitos después de cada tratamiento se utilizó la catalogación de Hunter y Macewicz (1983) para la anchoveta del norte *E. mordax*. El efecto de cada tratamiento sobre la maduración final ovocitaria fue determinado en base a la cuantificación de hembras con ovocitos vitelogenados (OV), ovocitos con núcleo migratorio (ONM), ovocitos hidratados (OH) y folículos post ovulatorios (FPO); considerando como estadio de madurez del pez al estadio ovocitario más avanzado encontrado en la gónada.

3.4 Determinación de Hormonas Esteroideas en plasma

Para obtener las muestras de sangre, los peces fueron cortados diagonalmente en el pedúnculo caudal, la sangre fue colectada en tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad bañados con heparina sódica. Las muestras fueron mantenidas a 5 °C y luego centrifugadas a 3500 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante fue colocado en tubos Eppendorf de 1,5 ml de capacidad y almacenado a -20 °C hasta su posterior análisis.

Se cuantificaron los niveles plasmáticos de la Testosterona (T), 17 β Estradiol (E2) y 17 α , 20 β dihidroxiprogesterona (17 α , 20 β DP) en los laboratorios de la Sección Oceanografía de la Universidad de la República, Montevideo – Uruguay empleando técnicas de radioinmunoensayo (RIA) según metodología descrita por Barrios (2005). Para ello, fue necesario preparar para cada hormona los siguientes productos químicos: solución TPG, solución stop, trazadores y antisueros.

Solución TPG:

Empleada para retomar los esteroides de las muestras, preparar la curva estándar y diluir los antisueros y trazadores. Compuesta por solución buffer fosfato (50 mM, 150 mM, NaCl, pH 7,4) y gelatina 0,1 %.

Solución Stop:

Empleada para detener la reacción de competencia entre el antígeno marcado (trazador) y el antígeno no marcado, separando la fase libre de la fase ligada. Contiene 500 mg de carbón, 50 mg de dextrán T/70 diluido en solución buffer fosfato.

Trazadores:

Son los esteroides radiomarcados. La cuantificación de su radioactividad fue empleada para determinar la cantidad del esteroide problema. Los trazadores [1, 2, 6, 7-³H]-Testosterona [sp.act.] = 95.0 Ci mmol⁻¹ y [2, 4, 6, 7-³H]-17β-Estradiol [sp.act.] = 92.0 Ci mmol⁻¹ fueron comprados, mientras que ³H-17, 20β DP por no estar disponible comercialmente fue sintetizado en el laboratorio de la Sección Oceanografía de la Universidad de la República. De estos trazadores se tomo una muestra de 100 µl las que fueron diluidas con TPG hasta una concentración entre 9000 – 13000 cpm (cuentas por minuto)

Antisueros:

Los antisueros empleados en este trabajo fueron obtenidos por inmunización de conjugados en conejos (esteroides unidos a albúmina sérica bovina) (INRA, Rennes, Francia). Los antisueros empleados, anti-Testosterona, anti-17β Estradiol y anti-17α, 20β dihidroxiprogesterona, fueron diluidos con solución TPG de una proporción de 1/50 a una proporción de 1/1600, 1/400 y 1/3000, respectivamente.

Por otro lado, los esteroides de las muestras fueron aislados por doble extracción usando una mezcla de acetato de etilo: ciclohexano (1:1). Una vez evaporada la mezcla, los esteroides se retomaron en 800 µl de solución TPG. Los componentes para la corrida del RIA fueron los siguientes:

Cuentas Totales (T):

Es el valor de CPM máximo de la hormona marcada radiactivamente, equivale al 100% de cpm. Es la mezcla de la solución TPG con el trazador, no lleva solución Stop debido a que no ocurre ninguna reacción de competencia.

Cuentas no específicas (Ns):

Nos da el valor del cpm producto de ninguna reacción de competencia entre el trazador y la muestra, su resultado está calificado como el valor de error del RIA. Es la mezcla de solución stop con el trazador.

Pegada Máxima (Bo):

Nos proporciona el valor de pegada máxima (mayor valor de cpm) que puede dar la unión del antisuero con el trazador. Es la mezcla de la solución TPG, el trazador y el antisuero.

Curva estándar:

Se estableció con 11 diluciones conocidas a partir de esteroides no radiomarcados (E2, T y 17α , 20β DP). Estas diluciones fueron mezcladas con sus respectivos trazadores y antisueros, estos últimos a concentraciones conocidas. A partir de los cpm registrados de la competencia entre el esteroide no radiomarcado y el trazador por el antisuero, se establecieron los valores teóricos de cpm para cada concentración. Esto fue necesario para interpolar los valores de cpm de la muestra y determinar la cantidad de esteroides por tubo en cada una de ellas. El límite de la curva estándar fue determinado en 3 pg/tubo.

Valor de muestra:

El valor de cpm es el resultado de la competencia de ligazón entre el trazador y los esteroides de la muestra por el antisuero. Son los esteroides separados del suero y retomados en solución TPG, estos esteroides fueron mezclados con sus respectivos trazadores y antisueros.

Luego de haber distribuido los T, Ns, Bo, curva estándar y muestras en tubos de 7 ml se les incubó a 18 °C por 20 horas, tiempo estimado para asegurar que ocurra la reacción de competencia de ligazón en los tubos que contenían el Bo, la curva y las muestras. La reacción fue detenida a 0 °C empleando solución stop (menos los totales), en seguida

los tubos fueron vortexeados, incubados a 2-3 °C durante 15 minutos y centrifugados a 4000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue trasvasado a tubos de centelleo de 5 ml, y luego se les agregó 4 ml de líquido de centelleo (Foto 5) para medir su radioactividad en un contador de centelleo beta Beckman modelo LS 6000IC (0 a 19 mEv). Los valores de cpm de las muestras fueron interpolados con los valores de cpm de la curva estándar para determinar la cantidad de esteroide por ml de sangre.

3.5 Análisis de datos

Para cada tratamiento se evaluaron las frecuencias de estadios ovocitarios y los niveles plasmáticos de Testosterona, 17β Estradiol y 17α , 20β dihidroxiprogesterona a las 0, 12, 24 y 48 horas pi a fin de evidenciar algún efecto producido por el GnRH α . Por otro lado, se correlacionó los niveles plasmáticos de T, E2 y 17α , 20β DP con los OV, ONM, OH, FPO-0 y FPO-1 para tratar de establecer el nivel hormonal esteroideo según el estadio de maduración final, desove y post desove. Este análisis solo integró los datos de las hembras inyectadas con GnRH α ya que los controles no presentaron avance de estadios más allá de OV.

3.6 Análisis Estadístico

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los estadios de maduración final de las hembras tratadas con GnRH α y GnRH α +DOM se emplearon tablas de contingencia. Los datos de niveles plasmáticos esteroideos fueron transformados con Log 10, la normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas se evaluó utilizando los tests estadísticos Lilliefors y F max, respectivamente. Para determinar la existencia de diferencia significativa entre los niveles plasmáticos esteroideos a diferentes tiempos de pi se utilizó ANDEVA de una vía y el test de Tukey para las comparaciones múltiples, mientras que para determinar si había diferencias entre los tratamientos se utilizó el test t-student con ajuste bonferroni. Los niveles plasmáticos de T, E2 y 17α , 20β DP en los estadios ovocitarios de la maduración final y desove se analizaron con ANDEVA de una vía y para las comparaciones múltiples se

utilizo el test de Tukey (Systat, versión 11.1). El nivel de probabilidad utilizado en todos los casos fue de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Efecto del GnRHa sobre la maduración final ovocitaria.

No se encontró diferencias significativas entre las frecuencias de estadios ovocitarios de los peces no tratados y los inyectados con solución salina (tabla de contingencia, $p > 0,05$) por lo que se les consideró como un solo grupo control (C) (Tabla 1).

El análisis histológico mostró que las hembras tratadas con H y HD presentaron OV a las 0 horas pi al igual que todas las hembras del grupo control (Figura 4).

Las hembras tratadas con H y HD evaluadas a las 12 y 24 horas pi mostraron gónadas con OV, ONM, OH y FPO sin presentar diferencias significativas (tabla de contingencia, $p > 0,05$); sin embargo, las hembras que fueron evaluadas por 48 horas, si presentaron diferencias significativas entre la frecuencia de estadios ovocitarios (tabla de contingencia, $p = 0,032$) (Figura 4).

Las hembras tratadas con H que fueron evaluadas a las 0 horas pi solo mostraron en sus gónadas OV, transcurridas las 12 horas pi empezó a observarse ONM (55,6%) luego, a las 24 horas pi además de las hembras con ONM (41,7%) se registraron hembras con OH (25%) y FPO-0 (25%). Finalmente, 48 horas pi se observó hembras con FPO-1 (45,5%), hembras con OV (27,3%), hembras con ONM (18,2%) y hembras con OH (9,1%) (Figura 4a).

Al igual que las anchovetas tratadas con H, las hembras tratadas con HD evaluadas a las 0 horas pi solo mostraron OV. Sin embargo, 12 horas pi además de observarse hembras con ONM (38,5%) se registraron FPO-0 (7,7%); a las 24 horas pi se observaron OH (21,4%) y FPO-0 (7,1%). Posteriormente, 48 horas pi solo se observaron hembras con OV (77,8%) y con OH (22,2%) (Figura 4b).

4.2 Efecto del GnRH α sobre los niveles plasmáticos de hormonas esteroideas.

No se encontró diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de los peces no tratados y los inyectados con solución salina (chi cuadrado, $p > 0,05$) por lo que se les consideró como un solo grupo control (C).

Testosterona

En todos los tratamientos (HD, H y C) los niveles de T presentaron la misma tendencia, no encontrándose diferencias significativas entre ellos (test t-student con ajuste bonferroni, $p > 0,05$) mientras que si las hubo al comparar los valores a los diferentes tiempos de pi (ANDEVA de una vía, $p < 0,001$) determinando que el grupo de 12 horas pi es significativamente diferente que los demás (Test de Tukey, $p < 0,05$) (Figura 5a).

Los niveles más altos de T se observaron 12 horas pi, siendo 7289 pg/ml en las tratadas con H y 7255 pg/ml en las tratadas con HD, luego 24 horas pi estos valores disminuyeron hasta 1939 pg/ml en H y 1612 pg/ml en HD. El grupo control también presentó su máximo nivel a las 12 horas pi (6883 pg/ml) disminuyendo a las 24 horas pi, hasta 2001 pg/ml (Figura 5a).

17 β Estradiol

No se hallaron diferencias significativas entre los valores de E2 de los tratamientos test t-Student con ajuste bonferroni, $p > 0,05$) pero si entre los valores de E2 a diferentes tiempos de pi (ANDEVA de una vía, $p = 0,010$). El test de Tukey determinó que los niveles de E2 a 48 horas pi fueron significativamente diferentes a los demás ($p < 0,05$). Por otro lado, el E2 presentó una tendencia creciente conforme transcurrió el tiempo de pi, alcanzando su máximo nivel a las 48 horas pi, siendo 1610 pg/ml en H, 2218 pg/ml en HD y 2067 pg/ml en el grupo control. (Figura 5b).

17 α , 20 β dihidroxiprogesterona

Para el caso de $17\alpha, 20\beta$ DP se encontró diferencias significativas entre los tratamientos H y C (test t-student con ajuste bonferroni, $p < 0,05$), sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los valores hormonales a diferentes tiempos de pi (ANDEVA de una vía, $p = 0,115$) (Figura 5c).

4.3 Niveles plasmáticos de T, E2 y $17\alpha, 20\beta$ DP durante el proceso de maduración final, desove y post desove en hembras de *E. ringens* inyectadas con GnRH α .

Testosterona

Los niveles de T en hembras con OV, ONM, OH, FPO-0 y FPO-1 fueron 3347 pg/ml, 5490 pg/ml, 2413 pg/ml, 1470 pg/ml y 3093 pg/ml, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de T plasmática en los estadios de maduración final ovocitaria (ANDEVA de una vía, $p = 0,347$) a pesar que los niveles de T en hembras con ONM hayan sido ligeramente mayores (Figura 6a).

17 β Estradiol

En el transcurso de la maduración final, desove y post desove los niveles circulantes de E2 fueron incrementándose desde 883 pg/ml en hembras con OV hasta 2338 pg/ml en hembras con FPO-1. Se observaron diferencias significativas entre los valores de E2 (ANDEVA de una vía, $p = 0,045$). El test de Tukey determinó que las diferencias de estos valores se encontraron en las hembras con ONM y las hembras con FPO-1 ($p = 0,020$) (Figura 6b).

17 $\alpha, 20\beta$ dihidroxiprogesterona

No se encontró diferencias significativas (ANDEVA de una vía, $p = 0,413$) entre los niveles de $17\alpha, 20\beta$ DP de los estadios de maduración final ovocitaria y post desove, variando los valores entre 325 pg/ml en OV y 408 pg/ml en FPO. (Figura 6c).

5. DISCUSIÓN

5.1 Efecto del GnRHa sobre la maduración final ovocitaria.

Los OV son ovocitos fisiológicamente inmaduros para ser evacuados, por ello el estímulo hormonal endógeno por parte de la LH es necesario para que éstos reinicien la meiosis y activen la maduración final (Nagahama, 2000). Sin embargo, algunas especies de peces reprimen este proceso bajo condición de cautiverio, razón por la cual el estímulo con hormonas exógenas o análogos de ellas es una alternativa ante esta problemática (García, 1995).

Trabajos anteriores han demostrado que la anchoveta peruana bajo condición de cautiverio alcanza la maduración gonadal pero no se activa la maduración final de los ovocitos ni se produce el desove (Espinoza *et al.*, 2006). Sin embargo, los resultados del presente trabajo demuestra que el estímulo hormonal exógeno con un análogo de GnRH logra activar la maduración final ovocitaria en individuos de anchoveta en cautiverio. El éxito de la activación de dicho proceso esta condicionado en inyectar hembras con ovocitos vitelogenados, de lo contrario la GnRH inyectada conllevaría a la síntesis de FSH y no de LH (Nagahama, 1987).

Las gónadas de las hembras evaluadas 12 horas pi presentaron ONM, evidenciando así que el uso del conceptual activa la maduración final ovocitaria, la que consiste en la migración de la vesícula germinal a la periferia por acción de 17α , 20β DP ó 17α , 20β , 21 TP (Nagahama, 1987). Experimentos en *Mugil cephalus* mostraron que la activación de la maduración final se producía 24 horas después de haber sido inyectados con CPE y LHRHa (Tamaru *et al.*, 1991).

Si bien la activación de la maduración final ovocitaria se evidenció 12 horas pi con la presencia de ONM, el avance de este proceso se corroboró 24 horas pi cuando las hembras tratadas con H y HD presentaron en sus gónadas ONM OH, y FPO-0, confirmando así que se estaba produciendo el desove de los ovocitos.

A diferencia de los peces tratados con H 48 horas pi, no se produjo ningún avance en la maduración final de los peces tratados con HD, lo que plantearía un posible efecto retardante por parte de la DOM. Similares resultados fueron obtenidos por Prat *et al.* (2001), quienes plantearon que combinaciones de GnRH_a+PIM no solo no mejoran el efecto del GnRH_a sino que inhibe el efecto de la hormona en *Dicentrarchus labrax*.

Debido a la presencia de OH y FPO-0 a las 24 horas pi en hembras tratadas con H, se esperó que a las 48 horas pi el porcentaje de hembras con FPO-1 hubiese sido cercano al 100% y no 45,5%. Esto indica que a pesar de la eficacia de la hormona como inductor del desove, la dosis suministrada no fue suficiente para permitir una liberación continua de LH; debido posiblemente a una rápida degradación de la cantidad de GnRH_a suministrada por acción de endopeptidasas. Trabajos en perca plateada revelaron que empleando una dosis de 0,02 μg g⁻¹ de GnRH_a solo se conseguía un 42,9% de desove, pero empleando dosis mayores de 0,03-0,04 μg g⁻¹ se conseguía un 100% de desove (Levavi-Sivan *et al.*, 2004).

Las técnicas de inyección a manera de dosis preparatoria y desencadenante son utilizadas principalmente con gonadotrofinas (Peter & Yu). Sin embargo, esta metodología ha sido empleada también al inyectar GnRH y GnRH_a, con la finalidad de prolongar el tiempo de vida media de los mismos (García, 1995, Prat *et al.*, 2001). Tal es el caso utilizado por Firat *et al.* (2005) en lubina europea *Dicentrarchus labrax*, donde la aplicación de 0,02 μg g⁻¹ de LHRH_a en dos dosis, desencadenó la maduración final y el desove.

Sin embargo, la ventaja de utilizar una sola dosis de hormona es que se evita el estrés de los peces producto de la manipulación; lo cual ha tenido resultados favorables en especies como *Heterobranchus bidorsalis* y *Bidyanus bidyanus* (Levavi-Sivan *et al.*, 2004; Adebayo & Fagbenro, 2004).

5.2 Efecto del GnRH_a sobre los niveles plasmáticos de hormonas esteroideas

Los niveles de T plasmática luego de que los peces fueran inyectados con la hormona, mostraron su mayor incremento 12 horas pi, tiempo en el cual el porcentaje de peces con ONM fueron mayores. Estos resultados coinciden con los presentados en *Mugil cephalus* donde este incremento resultaría ser una señal al cerebro o hipófisis de que la gónada se encuentra madura (Tamaru *et al.*, 1991). Asimismo, estudios en *Dicentrarchus labrax*, revelaron que el pico máximo de T se produce 24 horas pi, previo al rompimiento de la membrana de la vesícula germinal (Prat *et al.*, 2001)

El incremento de E2 plasmático en *E. ringens* tuvo su máximo valor después del desove, aproximadamente 48 horas pi. La anchoveta, por ser un pez de tipo asincrónico presenta gónadas con ovocitos previtelogenados y en plena vitelogénesis (Murua & Saborido-Rey, 2003), esto implica una síntesis continua de vitelogenina en el hígado por acción del E2 presente (Le menn *et al.*, 2000), por otro lado este aumento de E2 estaría implicado en el reclutamiento de nuevas ovogonias para el siguiente bache de desove, como lo descrito para otras especies con gónada de tipo asincrónico (Devlin & Nagahama, 2002).

Cuando los ovocitos dejan de incorporar vitelogenina en su citoplasma y se activa la maduración final con la migración de la vesícula germinal, la actividad de síntesis de la P450 arom decae, no habiendo conversión de T a E2 (Nagahama, 2000). Sin embargo, estudios en *Pagrus auratus* determinaron que el incremento de T y E2 plasmático dentro del tiempo en que se producen los desoves, se debe a una actividad esteroideogénica propia de folículos con ovocitos en plena vitelogénesis que se encuentran en la misma gónada (Pankhurst & Carragher, 1992).

Los bajos niveles de E2 en *E. ringens* entre las 0 y 12 horas pi coinciden con los mayores porcentajes de hembras con OV y ONM donde la síntesis de MIS aun no se produce o recién comienza, respectivamente. Sin embargo, a las 24 y 48 horas pi cuando los porcentajes de hembras con OH y FPO aumentaron, este incremento durante el desove y post desove se debe a los ovocitos previtelogénicos y en plena vitelogénesis que contiene la gónada (Figura 3f).

En los peces del grupo control los niveles de T y E2 a diferentes tiempos de pi no presentaron diferencias significativas con los niveles de los peces tratados con HD y H. Tratamientos de peces control puestos en tanques no acoplados al sistema de recirculación podrían haber descartado un posible efecto feromonal por parte de los peces inyectados con la hormona.

Tomando en cuenta que los niveles de $17\alpha, 20\beta$ DP de los peces tratados con H fueron significativamente mayores que los del grupo control, hace suponer en primera instancia que el MIS implicado en la activación de la maduración final del ovocito de *E. ringens* sea el $17\alpha, 20\beta$ DP. Sin embargo, no se registró diferencia significativa entre los niveles del MIS a diferentes tiempos de pi, posiblemente por no haber realizado el muestreo de sangre justo en el momento que se incrementó el MIS, momento que ocurre durante un corto tiempo y cuando la vesícula germinal empieza a romperse (Nagahama, 1994).

Al respecto, estudios *in vitro* han revelado que luego de ser sintetizado el $17\alpha, 20\beta$ DP éste es detectable alrededor de un máximo de 2 horas explicando así su rápido metabolismo (Migaud *et al.*, 2003).

Los resultados muestran que el efecto de la inyección de GnRHa sobre la activación de la maduración final de ovocitos de *E. ringens* se produjo 12 horas pi aproximadamente, momento en el cual se observó mayor proporción de hembras con ONM y 12 a 36 horas más tarde se produjo el desove. Posiblemente el período de 12 horas no permitió detectar el pico máximo de este MIS entre 12 y 24 horas pi; momento que coincide con el rompimiento de la membrana de la vesícula germinal.

Similares resultados fueron obtenidos por Prat *et al.* (2001), quienes no encontraron diferencias significativas entre los niveles de $17\alpha, 20\beta$ DP plasmáticos en *Dicentrarchus labrax*, infiriendo que la elevación de este MIS pudo haber ocurrido entre las 48 horas luego de la segunda inyección y el desove.

En *Mugil cephalus* el resultado del análisis del $17\alpha, 20\beta$ DP mostró que a las 30 horas pi se produjo el máximo nivel de este MIS, tiempo posterior a la migración de la vesícula germinal y previo al desove (Tamaru *et al.*, 1991). Del mismo modo, estudios

en *Bidyanus bidyanus* mostraron que este esteroide se incrementó gradualmente luego de la inducción con GnRH α , mostrando su máximo nivel 12 horas antes del desove (Levavi-Sivan *et al.*, 2004).

Por otro lado, la similitud de los niveles de 17 α , 20 β DP durante todo el experimento haría suponer que no se trate del MIS de *E. ringens*, sino posiblemente el 17 α , 20 β , 21 TP. Lamentablemente no se pudo disponer de este esteroide para realizar su cuantificación en los plasmas de anchoveta. Una de las primeras especies en las que se determinó la función de MIS al 17 α , 20 β , 21 TP fue *Micropogonias undulatus* (Trant & Thomas, 1989). Valores promedios alrededor de cero de 17 α , 20 β DP en *Dicentrarchus labrax* sugirieron al 17 α , 20 β , 21 TP como el MIS en esta especie (Alvariño *et al.*, 1992)

Asimismo, se ha observado la coexistencia de 17 α , 20 β DP y 17 α , 20 β , 21 TP en *Morone saxatilis* (Mylonas *et al.*, 1998) y *Morone Chrysops* (Mylonas *et al.*, 1997) comprobándose la función de ambos como MIS en estas especies. Asturiano en el 2000 sugirió que es posible que en algunas especies se presente un doble rol en ambos esteroides (Prat *et al.*, 2001). Asimismo, Barrios (2005) propuso que podría existir una acción sinérgica entre el 17 α , 20 β DP y el 17 α , 20 β , 21 TP en *Micropogonias furnieri*, proponiendo que la función inductora de la maduración recae en el 17 α , 20 β , 21 TP, así como en otros perciformes (Trant & Thomas, 1989; Thomas, 1994).

5.3 Niveles plasmáticos de T, E2 y 17 α , 20 β DP durante el proceso de maduración final, desove y post desove en hembras de *E. ringens* inyectadas con GnRH α .

Los niveles circulantes de hormonas esteroides en plasma dependen de la organización del ovario y de su desarrollo ovocitario, es decir, los peces con desarrollo ovárico de tipo sincrónico, grupo sincrónico o asincrónico presentan perfiles hormonales plasmáticos diferentes.

En las gónadas de los peces de tipo asincrónico se encuentran presentes ovocitos en todos los estadios de desarrollo, por lo que estos peces no están sujetos a una etapa reproductiva específica en el año ni a un solo desove en su vida como los peces de tipo grupo sincrónico y sincrónico, respectivamente. El grupo asincrónico esta representado por géneros como *Merluccius*, *Scombers*, *Engraulis* y en general todos los peces pelágicos pequeños (Murua & Saborido-Rey, 2003). Muy pocos estudios acerca de los cambios en los niveles esteroideos plasmáticos relacionados con el desarrollo ovocitario se han realizado en este tipo de peces, contrariamente a los estudios realizados en peces con desarrollo gonadal tipo sincrónico y grupo sincrónico (Rinchard *et al.*, 1993)

En este trabajo, los niveles de T en correlación con los estadios ovocitarios no mostraron una fluctuación que permita proponer alguna función de este andrógeno sobre la maduración final. Estudios anteriores determinaron que no esta claramente establecido en rol de la T como hormona esteroidea en las hembras (Rinchard *et al.*, 1993), pero si como precursor en la síntesis de E2 (Nagahama, 1994). Sin embargo, experimentos en *Gobio gobio* (Rinchard *et al.*, 1993) muestran que el incremento en los niveles de T al final de la vitelogénesis indicaría la madurez alcanzada por los ovocitos listos para ser ovulados, según observaciones de Kobayashi *et al.* (1987). En la anchoveta peruana este incremento de T se produjo cuando las hembras reportaron ONM, estadio que coincide con el momento previo a la ovulación.

Para el caso del E2 los resultados muestran una disminución de los niveles plasmáticos de E2 a medida que avanzaba la maduración final de los ovocitos, y un incremento considerable luego de producirse el desove. Estudios en *Sardinops melanostictus*, pez de tipo asincrónico, revelan que el E2 aumenta a medida que los gránulos de vitelo ocupan el citoplasma, disminuyendo cuando la vesícula germinal empieza su migración (Murayama *et al.*, 1994). Del mismo modo, en *Gobio gobio*, la disminución del E2 se produce a medida que empieza la maduración final de los ovocitos y se incrementa luego en post desove (Rinchard *et al.*, 1993). La síntesis de E2 va a depender de la necesidad de vitelo por los ovocitos, es decir mayor síntesis cuando el ovocito está en crecimiento y menor síntesis cuando esta completamente vitelogenado (Le Menn *et al.*, 2000; Nagahama 1987).

Los resultados de T y E2 en *E. ringens*, si bien no se ajustan a los perfiles hormonales clásicos de salmón (Estay *et al.*, 1998), se asemejan a los presentados en otras especies que no necesariamente tienen una gónada de tipo asincrónico (Rinchard *et al.*, 1993; Barrios, 2005). Por ejemplo, estudios en *Micropogonias furnieri* han señalado que las fluctuaciones de T si bien no fueron significativas están relacionadas a la función precursora del andrógeno, y el incremento significativo de E2 esta asociado a estadios ováricos en regresión (Barrios, 2005).

Varios trabajos acerca de los perfiles hormonales y su relación con los diferentes estadios ovocitarios u ováricos en especies de tipo grupo sincrónico se han llevado a cabo, estos resultados revelan que la T, contrario al E2, no muestra un patrón común en las especies de ese tipo (Mylonas *et al.*, 1998; Migaud *et al.*, 2003; Asturiano *et al.*, 2002). Tal es el caso de *Morone saxatilis* (Mylonas *et al.*, 1998) y *Perca fluviatilis* (Migaud *et al.*, 2003) donde se determinaron que los niveles de T fueron máximos antes del rompimiento de la vesícula germinal y a partir de la ovulación, respectivamente. Sin embargo, en ambas especies los niveles de E2 fueron máximos en la vitelogénesis y mínimos a medida que esta finalizaba y empezaba la migración del núcleo.

Por otro lado, estudios en *Dicentrarchus labrax*, revelaron que los niveles de T y E2 presentan variaciones importantes durante su etapa reproductiva, mostrando un incremento de T previo al de E2, lo que confirmaría su rol como precursor en la síntesis de este estrógeno (Asturiano *et al.*, 2002).

La homogeneidad de los niveles de 17α , 20β DP en los estadios ovocitarios analizados podría ser explicada por dos razones. La primera razón incurriría en la falta de muestreo de sangre en el momento en que el esteroide alcanzó su máximo nivel como se mencionó anteriormente. Experimentos en laboratorio demostraron que este incremento de MIS se da por un corto periodo de tiempo y ocurre justo antes de la ovulación, cuando la membrana de la vesícula germinal se rompe (Mylonas *et al.*, 1997; Mylonas *et al.*, 1998; Murayama *et al.*, 1994; Tamaru *et al.*, 1991).

La segunda razón que explicaría la falta de variación de los niveles de este MIS en los OV, ONM, OH, FPO-0 y FPO-1 es que quizás no se trate del MIS en *E. ringens*, como en *Micropogonias furnieri* donde los niveles de 17α , 20β DP tampoco mostraron

variación alguna previo ni durante el desove (Barrios, 2005). Al realizar el seguimiento del 17α , 20β DP a lo largo del desarrollo ovocitario de tratarse del MIS de *E. ringens* se podría identificar un incremento significativo justo antes del desove como lo manifestado en otras especies (Migaud *et al.*, 2003; Murayama *et al.*, 1994; Rinchard *et al.*, 1993)

Por otro lado, experimentos en otras especies marinas como *Cynoscion nebulosus* (Thomas, 1994), *Dicentrarchus labrax* (Asturiano *et al.*, 2002) y *Morone saxatilis* (Mylonas *et al.*, 1998) han coincidido con la presencia del 17α , 20β , 21 TP plasmático momentos previos al desove, de esta manera y como se ha mencionado anteriormente, no se descarta la posibilidad que el MIS implicado en la maduración final y desove en la anchoveta peruana sea el 17α , 20β 21 TP.

6. CONCLUSIONES

1. La inyección intraperitoneal de acetato de buserelina a $0,005 \mu\text{g g}^{-1}$ en una sola dosis activa la maduración final ovocitaria de hembras maduras de *E. ringens* 12 horas después de haber sido suministrada.
2. La combinación de acetato de buserelina con domperidona tendría un efecto retardante sobre el proceso de maduración final ovocitaria y desove.
3. La inyección del GnRHa evidenció que los perfiles hormonales de E2 disminuyen durante la maduración final y se incrementan en post desove.
4. Se sugiere que el $17\alpha, 20\beta$ DP podría estar implicado en la activación de la maduración final ovocitaria de *E. ringens* sin llegar a ser el principal MIS en este proceso, pudiendo recaer esta función en el $17\alpha, 20\beta, 21$ TP.

7. RECOMENDACIONES

1. Probar si dosis más altas o fraccionadas incrementan el efecto de la GnRHa sobre la liberación de gonadotrofinas endógenas a fin de conseguir un menor tiempo de respuesta o un mayor porcentaje de desove.
2. Comparar los niveles hormonales de T, E2 y 17α , 20β DP de individuos silvestres y en cautiverio de *E. ringens* para poder descartar el efecto que pudiese tener el confinamiento en cautiverio sobre la secreción de los mismos.
3. Realizar estudios sobre los niveles hormonales de T, E2 y 17α , 20β DP durante la maduración final en otros peces de interés pesquero y/o acuícola del Perú a fin de entender sus procesos reproductivos para un mejor manejo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adebayo, O. & O. Fagbenro. 2004. Induced ovulation and spawning of pond raised African giant catfish, *Heterobranchus bidorsalis* by exogenous hormones, *Aquaculture*, 242: 229-236.
- Alvariño, J.; S. Zanuy; F. Prat; M. Carrillo & E. Mañanos. 1992. Stimulation of ovulation and steroid secretion by LHRHa injection in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): effect of the time of day. *Aquaculture*, 102: 177-186.
- Asturiano, J.F.; L.A. Sorbera; J. Ramos; D.E., Kime; M., Carrillo & S. Zanuy. 2002. Group-synchronous ovarian development, ovulation and spermiation in the european sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) could be regulated by shifts in gonadal steroidogenics. *Scientia Marina*, 66: 273-282.
- Barrios, F. 2005. Determinación de los perfiles circulantes de esteroides gonadales y su relación con las variaciones histológicas del ovario de corvina blanca, *Micropogonias furnieri*, a lo largo de un ciclo reproductivo. Tesis para optar la Licenciatura de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica, Uruguay, 52 pp.
- Brzuska, E. & J. Adamek. 1999. Artificial spawning of European catfish, *Silurus glanis* L.: stimulation of ovulation using LHRHa, ovaprim and carp pituitary extract. *Aquaculture Research*, 30: 59-64.
- Chang, J.P.; K.L. Yu; A.O. Wong & R.E. Peter. 1990. Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release in vitro in goldfish. *Neuroendocrinology*, 51: 664-674.
- Cisneros, P.; C. Espinoza; B. Buitrón; A. Perea; V. Vera; M. Valdivia & D. Vizziano. 2006. Efecto de GnRHa y domperidona sobre el desove en cautiverio de la anchoveta peruana *Engraulis ringens*. En: XV Reunion Cientifica ICBAR, Lima, Perú. Libro de resúmenes: pp 86.

- Devlin, R.H. & Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*, 208: 191-364.
- Espinoza, C.; V. Vera; A. Perea & B. Buitrón. 2006. Effect of feeding ratio on gonadal maturation and fat accumulation in Peruvian anchovy (*Engraulis ringens* JENYNS). En: The International Conference "The Humboldt Current System", 27 Nov – 1 Dic 2006. Book of extended abstracts: 139-140.
- Estay, F.; R. Neira; N.F. Díaz; L. Valladares & A. Torres. 1998. Reproductive biology, gametogenesis and sex steroid profiles in cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*, Walbaum). *Journal of Experimental Zoology*, 280: 429-438.
- Firat, K.; S. Saka & C. Suzer. 2005. Gonadal oocyte development in LHRH hormone treated European Sea Bas (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) broodstock. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29: 83-87.
- García, A. 1995. Control hormonal de la reproducción e inducción de la maduración y puesta en los peces teleósteos. En: *Acuicultura, Biología Marina*. Zamora, S.; B. Agulleiro y M.P. García (Eds.). Selegráfica, S.L. España, pp: 139-165.
- Godinho, H.P. y A.L. Godinho. 1986. Induced spawning of the pacu, *Colossoma mitrei* (Berg, 1895), by hypophysation with crude carp pituitary extract. *Aquaculture*, 55: 69-73.
- Goren, A.; Y. Zohar; M. Fridkin; E. Elhanati & Y. Koch. 1990. Degradation of gonadotropin releasing hormone in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*: I. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH and their analogs in the pituitary. *General and Comparative Endocrinology*, 79: 291-305.
- Humason, G. 1979. *Animal Tissue Techniques*. 4th edn. San Francisco. W.H. Freeman.

- Hunter, J. & B. Macewicz. 1983. Measurement of Spawning frequency in multiple spawning fishes. In: R. Lasker, Ed. An eggs production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: application to the northern anchovy, *Engraulis mordax*. US Dep. Commer., NOAA Tech. Rep. NMFS 36, pp. 79-94.
- Kobayashi, M.; K. Aida; & I. Hanyu. 1987. Hormone changes during ovulation and effects of steroids hormones on plasma gonadotropin levels and ovulation in goldfish. *General and Comparative. Endocrinology*, 67: 301-307.
- Le Menn, F.; B. Davail; C. Pelissero, P. NDiaye, E. Bon, L. Perazzolo and J. Nunez Rodriguez. 2000. A new approach to fish oocyte vitellogenesis. En *Reproductive Physiology of Fish*. B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Anderson and S.O. Stefasson (Eds.). Proceedings of the 6th International Symposium. Book of extended abstracts: 281-288.
- Leong, R. 1971. Induced spawning of the northern anchovy, *Engraulis mordax*, Girard. National Marine Fisheries Service Fishery-Oceanography Center, La Jolla. *Fishery Bulletin*, 69 (2): 357-360.
- Levavi-Sivan, B.; R. Vaiman; O. Sachs & I. Tzchori. 2004. Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*, 229: 419-431.
- Migaud, H.; R. Mandiki; J. Gardeur; A. Fostier; P. Kestemont & P. Fontaine. 2003. Synthesis of sex steroids in final oocyte maturation and induced ovulation in female Eurasian perch, *Perca fluviatilis*. *Aquatic Living Resources*, 16: 380-388.
- Murayama, T.; M. Shiraishi & I. Auki. 1994. Changes in ovarian development and plasma levels of sex steroid hormones in the wild female Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*) during the spawning season. *Journal of Fish Biology*, 45: 235-245.

- Murua, H. & F. Saborido-Rey. 2003. Female reproductive strategies of marine fish species of the North Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 33: 23-31.
- Mylonas, C.C.; Y. Magnus; A. Gissis; Y. Klebanov & Y. Zohar. 1997. Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass. *Journal of Fish Biology*, 51: 234-250.
- Mylonas, C.C., L.C. Woods; P. Thomas & Y. Zohar. 1998. Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) in captivity, during post-vitellogenesis and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRH α -delivery systems. *General and Comparative Endocrinology*, 110: 276-289
- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. En: *Fish Physiology*. W. S. Hoar, D. J. Randall y E. M. Donaldson Eds. Academic Press, Inc. Londres, 4: 223-264.
- Nagahama, Y. 1987. Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zoological Science*, 4: 209-222.
- Nagahama, Y. 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *International Journal of Developmental Biology*, 38: 217-229.
- Nagahama, Y. 1997. 17 α , 20 β - Dihydroxy - 4 - pregnen - 3 - one, maturation - inducing hormone in fish oocytes: Mechanisms of synthesis and action. *Steroids*, 62: 190-196.
- Nagahama, Y. 2000. Gonadal steroid hormones: major regulators of gonadal sex differentiation and gametogenesis in fish. En *Reproductive Physiology of Fish*. B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Anderson and S.O. Stefansson (Eds.). *Proceedings of the 6th International Symposium. Book of extended abstracts*: 211-222

- Pankhurst, N. W. & J. F. Carragher. 1992. Oocyte maturation and changes in plasma steroid levels in snapper *Pagrus* (= *Chrysophrys*) *auratus* (Sparidae) following treatment with human chorionic gonadotropin. *Aquaculture*, 101: 337-347.
- Patiño, R. 1997. Manipulations of the reproductive system of fishes by means of exogenous chemicals. *The Progressive Fish Culturist*, 59: 118-128.
- Pauly, D. & M. Palomares. 1989. New estimates of monthly biomass, recruitment and related statistics of anchoveta (*Engraulis ringens*) off Peru (4-14 °S), 1953-1985. En: *The Peruvian upwelling ecosystem: Dynamics and interactions*. D. Pauly, P. Muck, J. Mendo and I. Tsukayama (Eds.). ICLARM Conference proceedings 18: 189-206.
- Peter, R. E.; H. R. Lin & G. Van der Kraak. 1988. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in china: advances in applications of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture*, 74: 1-10.
- Peter, R. & K. Yu. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspect. *Fish and Biology*, 7: 173-197.
- Prat, F.; S. Zanuy & 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.
- Redding, J.M. & R. Patiño. 1993. Reproductive Physiology. En: *The Physiology of Fishes*. D.H. Evans (Ed.). CRC Press, United State of America, pp: 503-533.
- Richard, E.P.; H. Lin & G. Van der Kraak. 1988. Induced ovulation and spawning of cultured freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture*, 74: 1-10.

- Rinchard, J.; P. Kestemont; E.R. Kühn & A. Fostier. 1993. Seasonal changes in plasma levels of steroid hormones in an asynchronous fish the Gudgeon *Gobio gobio* L. (Teleostei, Cyprinidae). *General and Comparative Endocrinology*, 92: 168-178.
- Rottmann, R.; J. Shireman y F. Chapman. 1991. Introduction to Hormone-induced spawning of fish. Southern Regional Aquaculture Center, 421.
- Santander, H.; J. Alheit y P. Smith. 1984. Estimación de la biomasa de la población desovante de la anchoveta peruana *Engraulis ringens* en 1981 por aplicación del método de producción de huevos. *Boletín del Instituto del Mar del Perú*, 8 (6): 213-250.
- Suquet M.; Y. Normant; J.L. Gaignon; L. Quéméner & C. Fauvel. 2005. Effect of water temperature on individual reproductive activity of pollack (*Pollachius pollachius*). *Aquaculture*, 243: 113-120.
- Tamaru, C.S.; C.D. Kelley; C.S. Lee; K. Aida; I. Hanyu & F. Goetz 1991. Steroid profiles during maturation and induced spawning of the striped Mullet, *Mugil cephalus* L. *Aquaculture*, 95: 149-168.
- Tan-Fermin, J. & A. Emata. 1993. Induced spawning by LHRHa and pimozide in the asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunter). *Ichthyology*, 9: 89-96.
- Thomas P. 1994. Hormonal control of final oocyte maturation in sciaenid fishes. In: *Perspectives in Comparative Endocrinology*. K.G. Davey; R.E. Peter; S.S. Tobe. (Eds.). National Research Council of Canada, Ottawa, pp. 619-525.
- Trant, J. M.; P. Thomas & C. Shackleton. 1986. Identification of 17, 20, 21-Trihydroxy-4-pregnen-3-one as the major ovarian steroid produced by the Teleost (*Micropogonias undulatus*) during final oocyte maturation. *Steroids*, 47: 89-99.

- Trant, J. M. & P. Thomas. 1989. Isolation of a novel maturation-inducing steroid produced in vitro by ovaries of Atlantic croaker. *General and Comparative Endocrinology*, 75: 397-404.
- Tresierra, A.; Z. Culquichicón & B. Veneros. 2002. bases de la reproducción. En: *Biología Reproductiva en Peces*. A. Tresierra, Z. Culquichicón, B. Veneros (Eds.). Editora Nuevo Norte, Trujillo, Perú, pp 35-69.
- Tyler, C.R.; J.P. Sumpter & P.M. Campbell. 1991. Uptake of vitellogenin into oocytes during early vitellogenic development in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Wallabaum). *Journal of Fish Biology*, 38: 681-689.
- Yan, L.; P. Swanson & W. Dickhoff. 1992. A two-receptor model for salmon gonadotropins (GTH I and GTH II). *Biology of Reproduction*, 47: 418-427.
- Yaron, Z.; G. Gur; P. Melamed; H. Rosenfeld; A. Elizur & B. Levavi-Sivan. 2003. Regulation of fish gonadotropins. *International Review of Cytology*, 225: 131-185.
- Zohar, Y., A. Goren; M. Fridkin; E. Elhanati & Y. Koch. 1990. Degradation of gonadotropin-releasing hormones in the gilthead sea bream *Sparus aurata*: II. Cleavage of native salmon GnRH mammalian LHRH and their analogs in the pituitary, kidney and liver. *General and Comparative Endocrinology*, 79: 306-331.

ANEXO

Anexo 1. Caracterización histológica de los ovocitos de la anchoveta del norte *Engraulis mordax* según descripciones de Hunter y Macewicz:

Ovocitos Vitelogenados (OV) (Figura 3a).

Los ovocitos están completamente vitelogenados, los gránulos de vitelo han ocupado todo el espacio citoplasmático, desde la periferia de su membrana hasta la zona perinuclear. Estos gránulos de vitelo por ser eosinófilos hacen que los ovocitos se tiñan de color grosella. La posición de la vesícula germinal o núcleo es central. Las células de la granulosa tienen una forma rectangular y ancha en cortes cruzados y sus paredes son evidenciadas claramente en cortes sagitales. La zona radiata es ancha, estriada y eosinofila.

Ovocitos con núcleo migratorio (ONM) (Figura 3b).

La vesícula germinal del ovocito migra hacia la periferia; los gránulos de vitelo empiezan a fusionarse unos con otros para formar una masa continua de vitelo que mantiene afinidad por la eosina.

Ovocitos Hidratados (OH) (Figura 3c).

La hidratación empieza cuando la vesícula germinal ha completado su migración a la periferia, la vesícula germinal de un ovocito hidratado no es visible porque después de terminar de migrar al polo animal la membrana nuclear se desintegra dispersando su contenido. Durante la hidratación, todos los glóbulos de vitelo se fusionan en una sola placa y el ovocito se expande grandemente, estrechando las células de la granulosa y la teca. Los ovocitos hidratados son los más efímeros de todas las clases de ovocitos, la hidratación ocurre antes de las 12 horas previas al desove.

Folículos post ovulatorios del día cero (FPO-0) (Figura 3d).

Luego de la ovulación, cuando el folículo se rompe, las células foliculares aparecen como cordones o pliegues. Las células de la granulosa, las cuales han sido extensamente estiradas durante la hidratación, aparecen alargadas y estrechas con un núcleo prominentemente largo y central, mientras que las células de la teca están más claramente definidas y adheridas a las células de la granulosa. La degeneración de los

folículos parece empezar luego de las 6-8 horas post desove, siendo la primera señal de la degeneración la presencia de pocos núcleos picnóticos en las células de la granulosa.

Folículos post- ovulatorios del día uno (FPO-1) (Figura 3e).

Estos folículos están muy encogidos o colapsados y tienen menos dobleces, por ello tiene una forma menos irregular que los folículos del día cero. El lumen, el cual es mucho mas reducido, puede contener algún material granular, pero en menor cantidad que en los folículos del día cero. Las células de la granulosa no están ordenadas y son pocas las células que aun tienen sus paredes intactas, la capa de células tecaes está presente aunque no es muy distinguible.

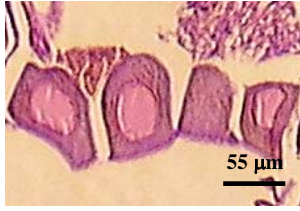
TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de hembras que presentaron ovocitos vitelogenados (OV), ovocitos con núcleo migratorio (ONM), ovocitos hidratados (OH) y folículos post ovulatorios (FPO) tratadas con y sin solución salina luego de las 0, 12, 24 y 48 horas post inyección.

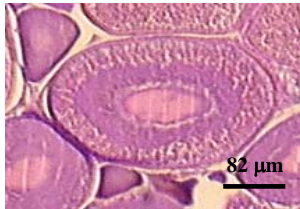
		Tiempo de evaluación (horas)			
		0	12	24	48
Sin Inyección	OV	3	7	5	6
	ONM	0	0	1	0
	OH	0	0	0	0
	FPO	0	0	0	0
Solución Salina	OV	3	7	17	6
	ONM	0	0	0	0
	OH	0	0	0	0
	FPO	0	0	0	0

FIGURAS

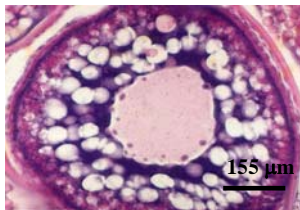
ESTADIOS DE MADUREZ OVOCITARIA



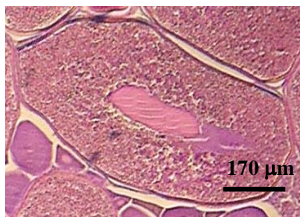
Ovocito inmaduro



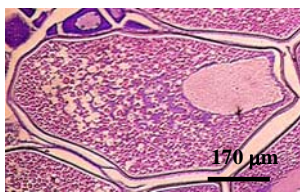
Ovocito previtelogenado



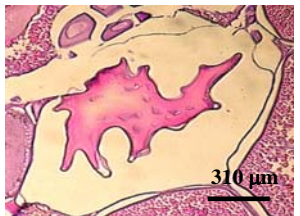
Ovocito plena vitelogenesis



Ovocito vitelogenado



Ovocito núcleo migratorio



Ovocito hidratado

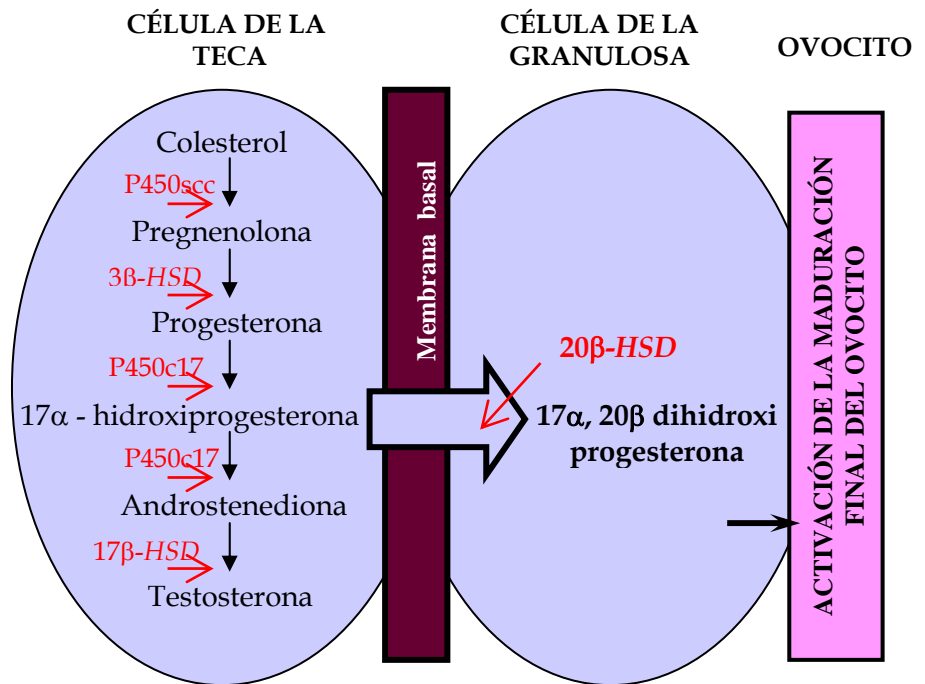
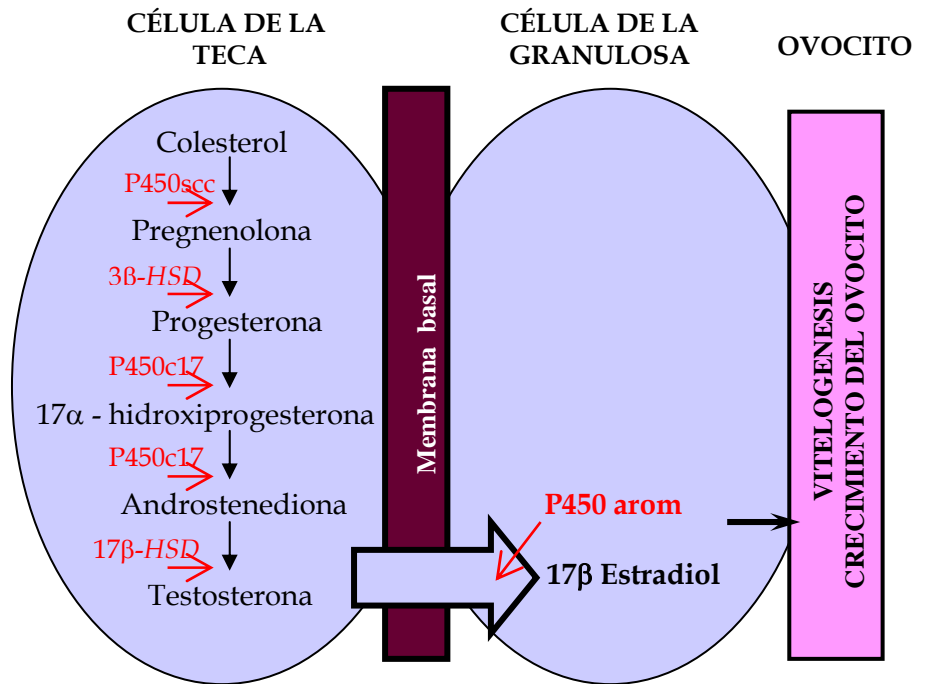


Figura 1. Ovogénesis y su control hormonal en peces.

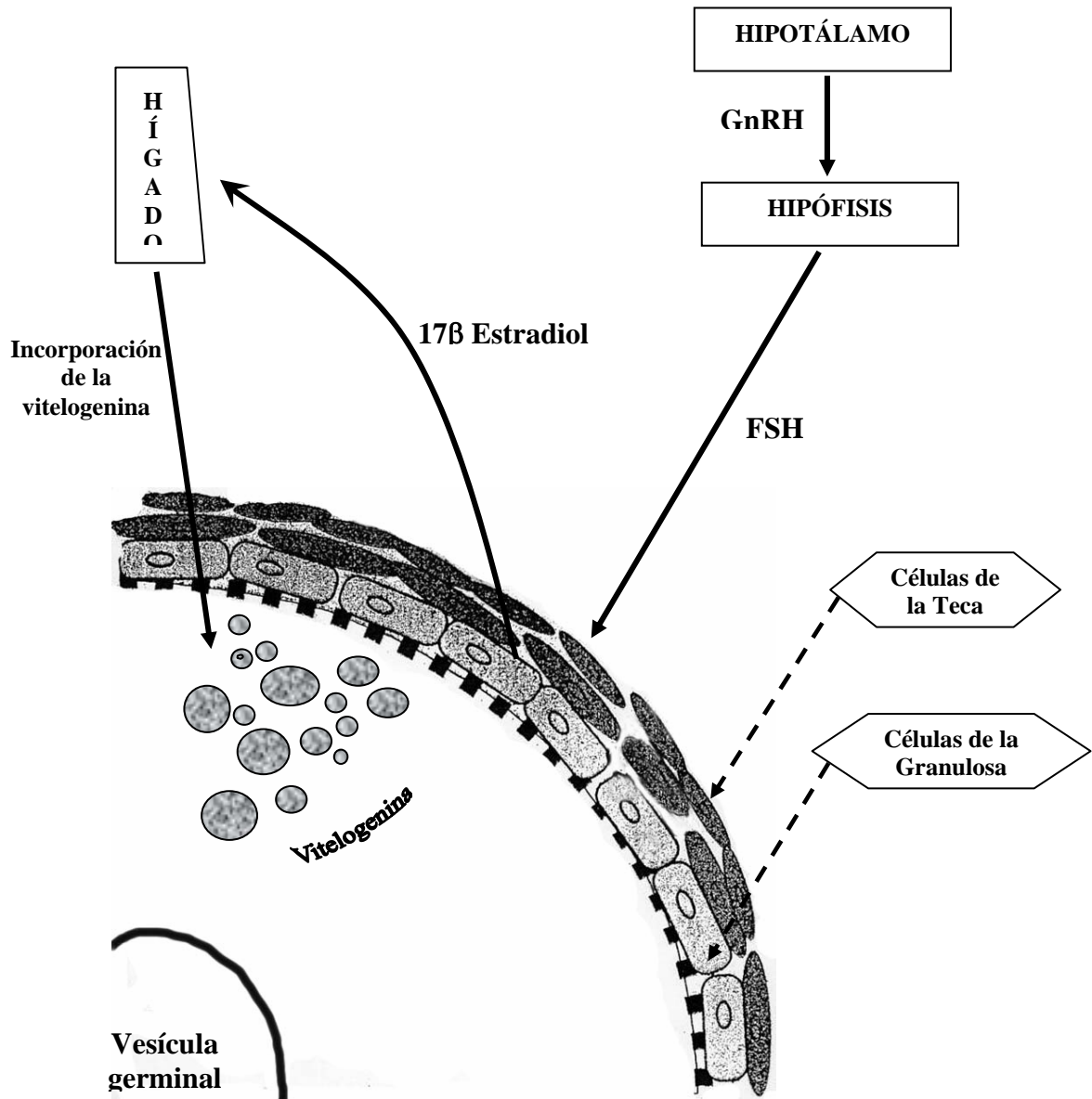


Figura 2. Síntesis hepática de vitelogenina y su control hormonal en peces.

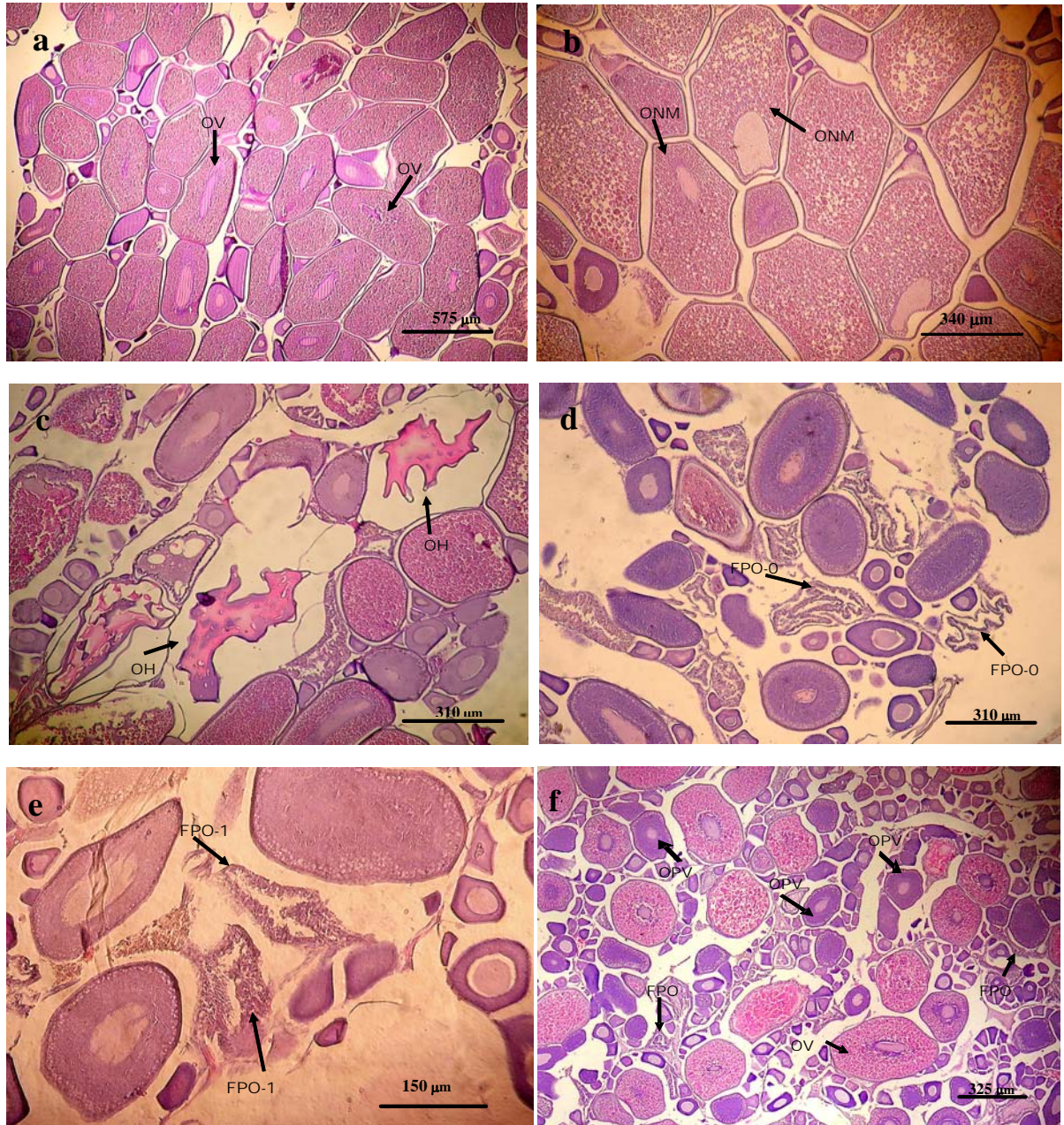


Figura 3. Cortes histológicos de los ovocitos y folículos post ovulatorios de *Engraulis ringens*. a) Ovocitos vitelogenados (OV), b) Ovocitos con núcleo migratorio (ONM), c) Ovocitos hidratados (OH), d) Folículos post ovulatorios del día cero (FPO-0), e) Folículos post ovulatorios del día uno (FPO-1), f) Ovocitos previtelogenados (OPV) en la misma gónada donde hay folículos post ovulatorios (FPO) lo que indica que mientras se produce el desove también se produce el reclutamiento de nuevos ovocitos.

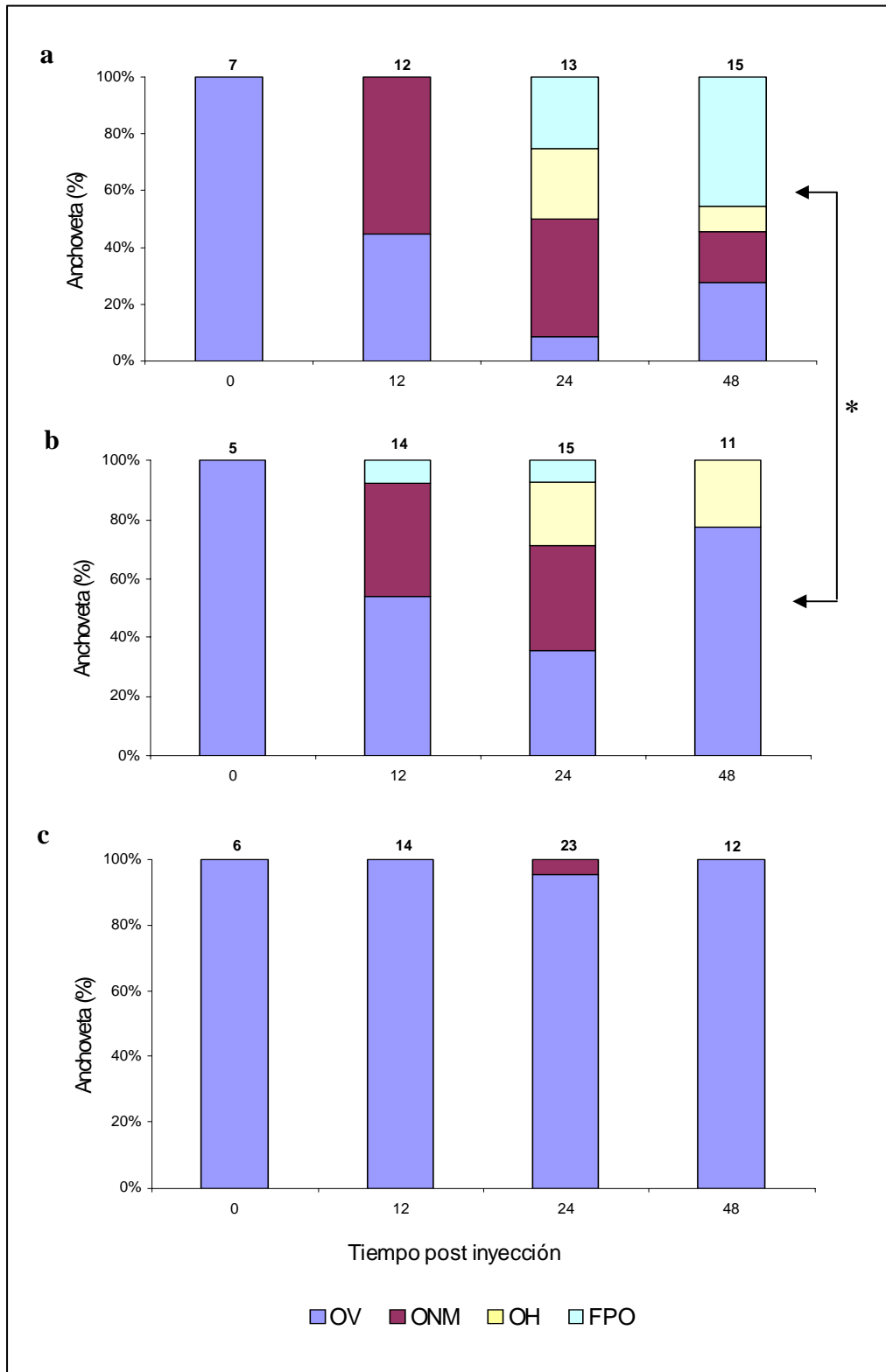


Figura 4. Efecto de GnRHa $0,005\mu\text{g g}^{-1}$ (a), GnRHa $0,005\mu\text{g g}^{-1}+\text{DOM } 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ (b) y control (c) sobre la maduración final ovocitaria. Los números sobre las barras indican la cantidad de peces inyectados. Sólo se observó diferencia significativas entre los tratamientos a las 48 horas post inyección (tabla de contingencia, $p=0,032$).

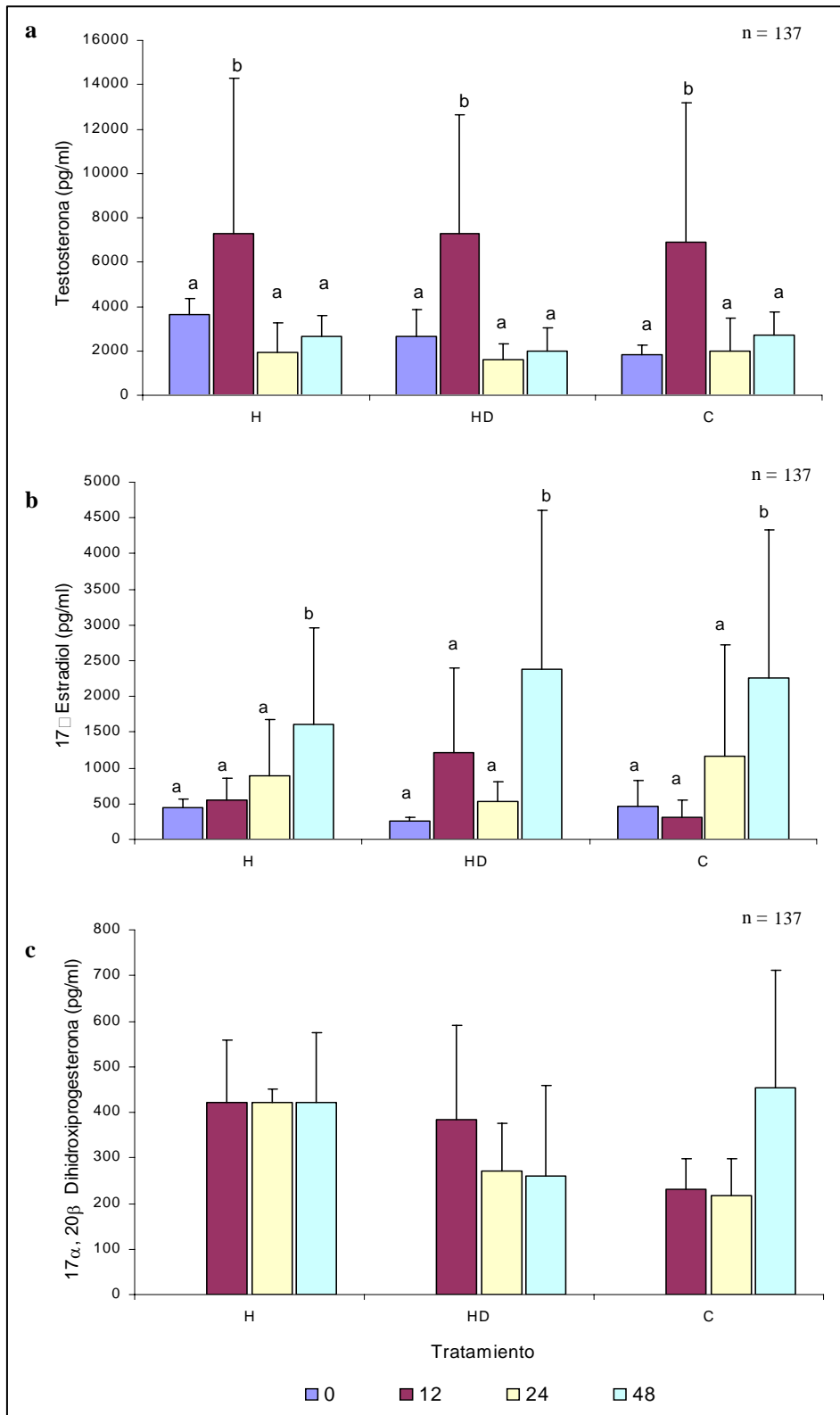


Figura 5. Efecto de GnRH α 0,005 μ g g $^{-1}$ (H), GnRH α 0,005 μ g g $^{-1}$ +DOM 0,01 mg g $^{-1}$ (HD) y control (C) sobre los niveles plasmáticos de Testosterona (a), 17 β Estradiol (b) y 17 α , 20 β dihidroxiprogestero (c) en hembras de anchoveta peruana. Las letras sobre las barras indican las diferencias entre los niveles plasmáticos esteroideos; n: número de peces tratados. Sólo se registraron diferencias significativas en los niveles de T y E2 a diferentes tiempos de pi ($p < 0,05$). El test de Tukey determinó que las diferencias ocurrían a las 12 y 48 horas pi, respectivamente. Para 17 α , 20 β DP solo se registro diferencia significativa entre los tratamientos (t-student con ajuste bonferroni, $p < 0,05$)

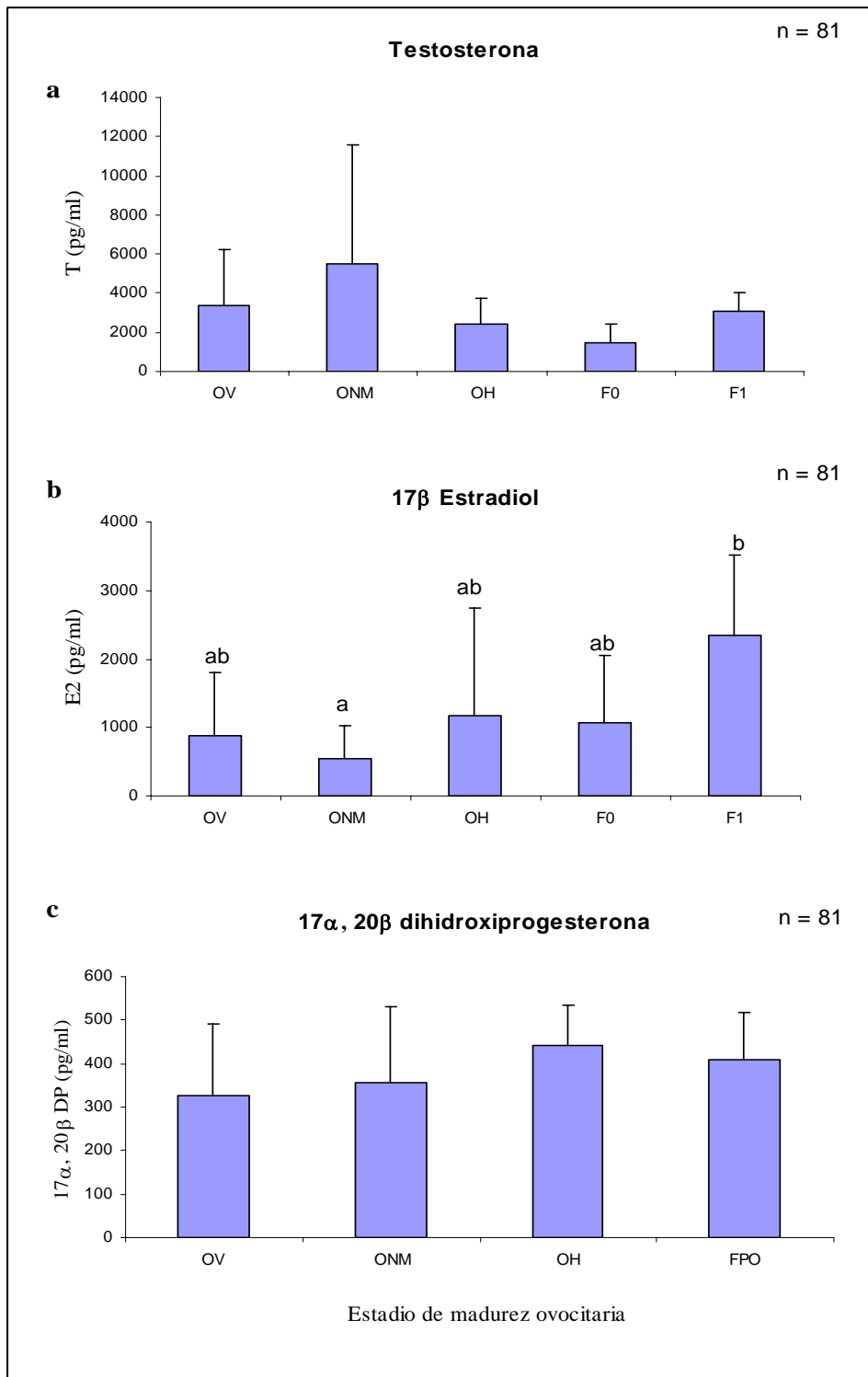


Figura 6 Niveles plasmáticos de Testosterona (a), 17β Estradiol (b) y 17α, 20β dihidroxiprogesterona (c) durante el proceso de maduración final, desove y post desove en hembras de *E. ringens* tratadas con GnRH α 0,005 μ g g $^{-1}$ (H) y GnRH α 0,005 μ g g $^{-1}$ +DOM 0,01 mg g $^{-1}$ (HD). Las letras sobre las barras indican las diferencias entre los niveles de E2; n: número de peces tratados. Sólo se registraron diferencias significativas entre los niveles plasmáticos de E2 en los diferentes estadios de maduración final (ANOVA de una vía, p>0,05), el test de Tukey determino que la diferencia ocurría entre las hembras con ONM y con FPO-1 (p = 0.020)

FOTOS



Foto 1. Captura de anchoveta empleando sistema de red izada y atracción con luces



Foto 2. Tanques de experimentación de 2m³.



Foto 3. Inyección intraperitoneal de la hormona utilizando aguja hipodérmica N° 29.

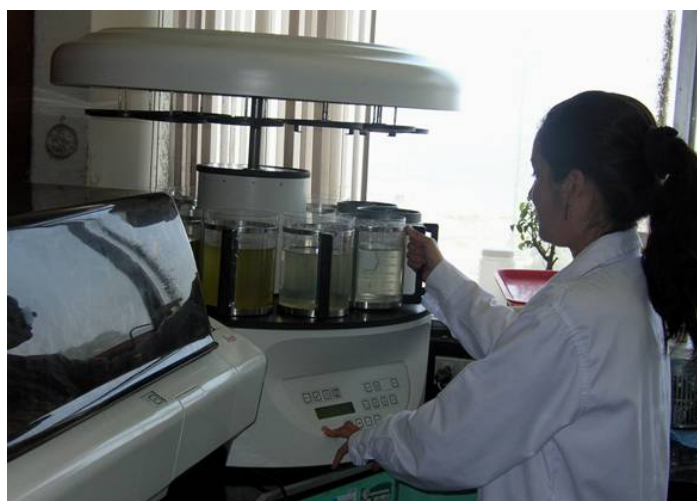


Foto 4. Procesamiento de las muestras de gónada en el procesador automático de tejidos.



Foto 5. Procesamiento de las muestras de esteroides para el RIA.

GLOSARIO

C: Grupo control que incluye a los peces inyectados con solución salina y los que no fueron inyectados.

DOM: Domperidona.

E2: 17 β Estradiol.

FPO: Folículo post ovulatorio.

FPO-0: Folículo post ovulatorio de 0 días.

FPO-1: Folículo post ovulatorio de 1 día.

FSH: Hormona folículo estimulante.

GnRH: Hormona liberadora de gonadotrofina.

GnRH α : Análogo de hormona liberadora de gonadotrofina.

Gónada tipo asincrónico: Presenta ovocitos en todos los estadios de desarrollo sin llegar a dominar algún estadio en particular. Sólo cuando ocurre la hidratación se observa claramente un grupo de ovocitos con diámetro muy diferente, el desove no está sujeto a una etapa reproductiva establecida. Ejemplo: *Engraulis ringens*, *Scomber japonicus*.

Gónada tipo grupo sincrónico: En este tipo de gónada se pueden diferenciar al menos 2 poblaciones de ovocitos en cualquier momento del desarrollo, una población de ovocitos grandes y una población heterogénea de ovocitos más pequeños. Los ovocitos de mayor tamaño son desovados en la etapa reproductiva en curso mientras que los más pequeños son desovados en la siguiente. Ejemplo: *Hippoglossus hippoglossus*, *Scophthalmus maximus*.

Gónada tipo sincrónico: Todos los ovocitos de la gónada desarrollan y ovulan al mismo tiempo; este tipo de ovario se encuentra en peces que desovan una vez en su vida y luego mueren. Ejemplo: *Oncorhynchus sp.* *Anguilla sp.*

GtH: Hormona gonadotrofina.

H: Se refiere a las hembras tratadas con GnRH α .

HD: Se refiere a las hembras tratadas con GnRH α +DOM.

LH: Hormona luteinizante.

OH: Ovocitos hidratados.

OPV: Ovocitos previtelogenados.

NM: Ovocitos con núcleo migratorio.

OV: Ovocitos vitelogenados.

pi: Post inyección.

T: Testosterona.

17 α , 20 β DP: 17 α , 20 β dihidroxiprogesterona.

17 α , 20 β , 21 TP: 17 α , 20 β , 21 trihidroxiprogesterona.

