



Respuesta reproductiva a la inducción hormonal en *Gymnotus* sp. (Teleostei, Gymnotiformes)

López, P.A.^{1,2*}; Rodrigues Ferreira Machado, M.³; de Oliveira Felizardo, V.⁴;
Murgas, L.D.S.⁴; Vigliano, F.A.^{1,2,5}

¹Cátedra de Piscicultura, Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional de Rosario (UNR, Argentina). ²Centro de Investigaciones en Piscicultura Experimental (CIPEX-FCV-UNR, Argentina). ³Unidade Acadêmica Especial de Ciências Biológicas, Departamento de Morfofisiologia, Universidade Federal de Jataí (UFJ, Brasil). ⁴Departamento de Medicina Veterinária (DMV), Universidade Federal de Lavras (UFLA, Brasil). ⁵Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina). ✉ pablolopez@unr.edu.ar

Resumen

El desarrollo tecnológico para el cultivo de *Gymnotus* sp. es relevante porque este género tiene un impacto socioeconómico en regiones sudamericanas donde la pesca deportiva es una actividad importante. Aunque *Gymnotus* sp. se reproduce en cautiverio, la supervivencia de los alevines en los estanques puede ser insuficiente para un sistema de cultivo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de diferentes parámetros reproductivos a la inducción hormonal en *Gymnotus* sp. con extracto bruto de hipófisis de carpa (EBH) y hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). Las muestras de gametos del tratamiento con EBH se extrajeron 12 y 20 horas después de la dosis desencadenante, las muestras del tratamiento con GnRH se extrajeron 10 y 12 horas después de la aplicación hormonal. El porcentaje de ovocitos con vesícula germinal periférica (%OVGP) y el diámetro de los ovocitos mostraron diferencias significativas entre grupos tratados con EBH con un intervalo captura-inducción (IC-I) de corta duración, con reproductores en etapas avanzadas de desarrollo gonadal. Se pudieron extraer ovocitos con éxito a dos hembras inducidas con EBH, 12 horas después de la dosis desencadenante y, además, se extrajo semen sólo de los machos inducidos con EBH. La estimulación con GnRH no dio resultados positivos en las diferentes dosis e IC-I utilizados, dado que no se pudieron extraer gametos. Este trabajo es la primera descripción de los parámetros de calidad del semen en *Gymnotus* sp. Futuras líneas de trabajo deberán centrarse en el manejo de variables ambientales para establecer una estrategia de reproducción que se pueda utilizar a nivel productivo.

Palabras clave: reproducción artificial, hipofisación, gametos, semen, fertilización.

Reproductive response of *Gymnotus* sp. (Teleostei: *Gymnotiformes*) to hormonal induction

Abstract. Technological development for *Gymnotus* sp. farming is relevant because this species has a socio-economic impact in South American regions where sport fishing is an important activity. Although *Gymnotus* sp. breeds in captivity, fry survival in ponds can be unacceptable for culture systems. The objective of this work was to test the response to hormonal induction of *Gymnotus* sp. with carp pituitary extract (CPE) and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in relation to different male and female reproductive parameters. CPE treatment specimens were stripped 12 and 20 hours after the triggering dosage, and GnRH treatment specimens were stripped 10 and 12 hours after hormonal application. We could obtain positive results using CPE with a short capture-induction interval (C-II) with broodstock in mature stages of gonadal development. Percentage of oocytes with peripheral germinal vesicle (%OPGV) and oocyte diameter showed significant differences between groups treated with CPE. Oocytes could be successfully extracted from two females treated with CPE and stripped 12 hours after the last dosage. Semen was only extracted from males treated with CPE. GnRH stimulation did not give positive results because gametes could not be extracted with different doses and C-II used. This work is the first description of semen quality parameters in *Gymnotus* sp. Future works should focus on combining hormonal induction strategies with CPE and the management of environmental variables.

Key words: artificial reproduction, hypophysation, gametes, semen, fertilization.

INTRODUCCIÓN

La pesca de morenas (*Gymnotus* sp.) constituye una actividad económica de sustento para los pescadores artesanales que proveen a la pesca deportiva. La pesca deportiva ha logrado en los últimos años un papel de privilegio como actividad económica en la región litoral del país motorizando el turismo. A la par de su crecimiento moviliza demandas de diferentes servicios, siendo la provisión de carnada de fundamental importancia entre ellos. *Gymnotus* sp. es el género más importante por el volumen de venta y sus aptitudes como carnada para la pesca de grandes peces carnívoros de río abierto en el noreste y litoral de la República Argentina, Paraguay y Brasil. En Brasil, la morena contribuye en un 50% a la captura total de carnadas registrada en la región del Pantanal (Mato Grosso do Sul), la cual se calcula en unos 15 millones de ejemplares al año (Rotta 2004). Hasta el presente, todos los ejemplares comercializados son obtenidos del medio natural por lo que, las poblaciones naturales de esta especie se encuentran bajo intensa presión de pesca (Almirón et al. 2008). Por lo tanto, el desarrollo de herramientas tecnológicas para el cultivo de la misma es relevante, debido a la importancia socioeconómica en regiones donde la pesca deportiva es una actividad económica significativa.

Aunque *Gymnotus* sp. se reproduce en cautiverio, la supervivencia de los alevines en estanques puede ser insuficiente para los sistemas de cultivo debido al canibalismo entre especímenes de diferente tamaño (Barrios et al. 2011). El uso de las biotecnologías aplicadas para mejorar aspectos de la reproducción y la nutrición en diferentes etapas del desarrollo, teniendo en cuenta las condiciones ambientales son necesarias para la cría de distintas especies en piscicultura (Díaz y Neira 2005). Un protocolo para controlar el proceso de reproducción en condiciones de laboratorio, podría contribuir al desarrollo del ciclo completo de producción. En este sentido, la manipulación hormonal puede permitir el uso del período reproductivo con mayor eficiencia en especies de peces que podrían reproducirse en estanques (Carrillo et al. 2009). El control y la cuantificación de variables que caracterizan el evento reproductivo adquieren una relevancia fundamental para desarrollar un protocolo adecuado para la reproducción artificial de una especie en cautiverio (Vazzoler 1996).

El uso de extracto bruto de hipófisis de carpa (EBH) implica la inyección de hormonas gonadotróficas (GTH), principalmente hormona luteinizante, para reemplazar los estímulos que inducen la esteroidogénesis, la maduración gonadal y finalmente, el desove (Valdebenito 2008). La hipofisación se ha utilizado en la mayoría de las especies de peces de cultivo. Este método se ha estandarizado a una dosis de inicial con 10-20% del total de volumen a suministrar y otra dosis desencadenante con el 80-90% restante (Zohar y Mylonas 2001). La hipofisación implica la administración de hormonas y osmorreguladores presentes en la hipófisis que pueden afectar negativamente la fisiología del pez receptor. Otros inconvenientes son la variabilidad del EBH en el contenido de GTH II y la posible transmisión de enfermedades (Mylonas et al. 2010).

La hormona liberadora de gonadotrofinas sintética (GnRH) se utilizó con éxito en muchas especies de peces

con diferentes ciclos de vida (Valdebenito 2008). La GnRH actúa a un nivel diferente desencadenando una serie de cascadas endocrinas en las células del lóbulo anterior de la adenohipófisis que modulan la actividad pituitaria en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (Carrillo et al. 2009) controlando la liberación de GTH del hipotálamo y proporcionando una mejor integración de procesos reproductivos (Mylonas et al. 2010). Las GTH endógenas actúan en las gónadas para inducir la esteroidogénesis, el proceso de maduración de los ovocitos y la espermiación (Mylonas et al. 2010). Las GnRH sintéticas demostraron ser más potentes y duraderas que las nativas (Valdebenito 2008). Esta hormona no tiene efectos específicos de especie y no hay posibilidad de transmisión de enfermedades (Carrillo et al. 2009).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de *Gymnotus* sp. a la inducción hormonal con EBH y GnRH mediante la caracterización de diferentes parámetros reproductivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos experimentales se realizaron bajo las normas éticas del CONCEA-Brasil y formaron parte de la tesis doctoral de Pablo Andrés López (DOC. N° 003779 FCV-UNR). Fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación y la Junta Directiva de la FCV-UNR (Argentina), resolución N° 145/12.

Experimento 1: inducción hormonal con EBH.

Treinta y ocho ejemplares adultos de *Gymnotus* sp. (longitud media total (Lmt) 316 ± 23 mm, peso medio (Pm) $115,16 \pm 30,93$ g) de la cuenca del río Grande (Estado de Minas Gerais, Brasil) fueron capturados y transportados a las instalaciones de animales del Departamento de Medicina Veterinaria de la Universidad Federal de Lavras (MG, Brasil), donde los peces se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos. Los ejemplares se mantuvieron en tanques de 1000 l a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, con aireación y fotoperíodo determinado por entrada de luz natural en noviembre, con 13 horas de luz: 11 de oscuridad, para su aclimatación. Los peces fueron alimentados diariamente con lombrices de tierra y mantenidos en ayunas 24 horas antes de la administración de EBH. Este período de aclimatación, definido como intervalo captura-inducción (IC-I), tuvo duración de una semana.

El EBH se preparó en solución salina esterilizada, utilizando hipófisis de *Cyprinus carpio* adultas (Argent) y se aplicó en dos dosis intramusculares diferentes, $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ (dosis inicial) y $5,0 \text{ mg kg}^{-1}$ (dosis de resolución) con 8 horas entre cada dosis. Durante la inducción y el masaje de la zona abdominal para obtener gametos, no se utilizaron anestésicos. Los peces tratados con EBH se dividieron en dos grupos; al primero (6 hembras, 9 machos) se le aplicaron masajes sobre el abdomen en sentido caudo-craneal 12 horas después de la dosis desencadenante (EBH12), mientras que el segundo grupo (4 hembras, 9 machos) recibió los masajes en zona abdominal 20 horas después de la dosis final (EBH20). Al mismo tiempo, los peces del grupo de control (5 hembras, 5 machos) recibieron $0,5$ y 1 ml de solución salina esterilizada y fueron masajeados 20 horas después de la segunda dosis.

Después de aplicar masajes en región abdominal, todos los animales fueron eutanasiados por inmersión en una solución de benzocaína (200 ppm) para el muestreo de gónadas y determinación del sexo.

Experimento 2: inducción hormonal con GnRH sintética. Quince ejemplares adultos de *Gymnotus* sp. (Lmt $244,1 \pm 8,88$ mm, Pm $40,2 \pm 5,01$ g) de la cuenca del río Paraná (Corrientes, Argentina) fueron capturados y transportados a las instalaciones del Centro de Investigaciones en Piscicultura Experimental (CIPEX), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario (Santa Fe, Argentina). Los peces se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos y se mantuvieron en tanques de 300 l a $23 \pm 2,8^\circ\text{C}$ con aireación para su aclimatación. Los especímenes fueron alimentados diariamente con lombrices de tierra y mantenidos en ayunas 24 horas antes de la inducción hormonal. El IC-I fue de 16 semanas para este ensayo, un periodo mayor al que se obtuvieron reproducciones en sistemas seminaturales (Barrios et al. 2011). Dado que los reproductores se consiguieron en diferente época, se mantuvieron en agua con la temperatura adecuada hasta realizar este segundo experimento con el mismo fotoperíodo utilizado en el anterior.

Se aplicó por vía intramuscular una solución sintética de GnRH (GnRH, Río de Janeiro) que contenía $4,2 \mu\text{g}$ de acetato de buserelina ml^{-1} . Las seis hembras recibieron una primera dosis con $0,25 \text{ ml kg}^{-1}$ y luego de 12 horas se les suministró la dosis desencadenante de $0,75 \text{ ml kg}^{-1}$. Los cinco machos recibieron una dosis única de $0,5 \text{ ml kg}^{-1}$ (Sampaio Paulino et al. 2011). Los peces tratados con GnRH se dividieron en dos grupos; al primero (2 hembras, 2 machos) se le aplicó presión sobre la zona abdominal 10 horas después de la dosis desencadenante (GnRH10), mientras que el segundo grupo (4 hembras, 3 machos) fue masajeado 12 horas después de la dosis final (GnRH12). Los peces del grupo de control (2 hembras, 2 machos) recibieron $0,5$ y 1 ml de solución salina esterilizada y estos especímenes fueron masajeados 12 horas después de la segunda dosis. No se realizó muestreo de gónadas con la intención de establecer un plantel de reproductores después de la experiencia.

Experimento 3: inducción hormonal con EBH y GnRH sintética en combinación con el manejo de las condiciones ambientales. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos anteriores (experimentos 1 y 2) se realizó un nuevo ensayo aplicando algunas variaciones en las dosis hormonales, tiempo de acción y manipulación ambiental de determinadas variables. Veinticuatro adultos de *Gymnotus* sp. (Lmt $208,7 \pm 17,53$ mm, Pm $26,8 \pm 7,41$ g) de la cuenca del río Paraná (Formosa, Argentina) fueron capturados y transportados a las instalaciones del CIPEX. Los peces se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos y se mantuvieron en tanques de 300 l con aireación para su aclimatación. Fueron alimentados diariamente con lombrices de tierra y mantenidos en ayunas 24 horas antes de la aplicación de hormonas. El IC-I fue establecido en 8 semanas, periodo mínimo en el que se obtuvieron reproducciones en sistemas seminaturales (Barrios et al. 2011). La temporada de reproducción en febrero, estaba en etapa avanzada cuando se obtuvieron los reproductores

y se debió controlar el fotoperíodo para realizar el experimento antes que el agua comience a enfriarse por el comienzo del otoño. Durante este tiempo se mantuvo un fotoperíodo similar al de los experimentos previos (12 horas de luz: 12 horas de oscuridad con luz artificial y se manipuló la conductividad del agua, agregando a cada tanque 2 l de agua destilada (semanalmente en las semanas 1 a 6; diariamente en las semanas 7 y 8) para disminuir la conductividad eléctrica de la misma. El fotoperíodo y el agua añadida se utilizaron como factores proximal predictivo y sincronizador, respectivamente (Vazzoler 1996). La conductividad del agua se registró con equipo multiparamétrico (Hanna 9813-6, Hanna Instruments, Smithfield, RI, EE.UU.) al inicio del experimento y antes de la administración de hormonas. También se introdujeron penachos de nylon atado para simular plantas acuáticas en todos los tanques durante el período de aclimatación.

La inducción hormonal de los peces se realizó por inyección a través de la vía intramuscular como se describe en la Tabla 1 de acuerdo con lo realizado en los experimentos anteriores, peces tratados con EBH masajeados 12 horas después de la dosis desencadenante (EBH12), 2 grupos de peces tratados con diferentes dosis de GnRH masajeados 12 horas después de la dosis desencadenante (GnRH12-1 y GnRH12-2) y grupo control inyectado con solución fisiológica estéril masajeado también, 12 horas después de la última aplicación. Las muestras se trataron secuencialmente el mismo día. Se aplicó presión sobre el abdomen de los animales para obtener gametos 12 horas después de la última dosis. Este procedimiento se realizó sin anestesia. La temperatura del agua fue de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ durante la inducción hormonal.

Tabla 1. Esquema de inducción hormonal.

Grupo	n (parejas)	Dosis
EBH12	4	1D: $0,1 \text{ ml kg}^{-1}$ 2D: 1 ml kg^{-1}
GnRH12-1	3	1D: $0,25 \text{ ml kg}^{-1}$ 2D: $0,75 \text{ ml kg}^{-1}$
GnRH12-2	3	1D: $0,25 \text{ ml kg}^{-1}$ 2D: 1 ml kg^{-1}
Control	2	1D: $0,2 \text{ ml kg}^{-1}$ 2D: 1 ml kg^{-1}

D (dosis): 1 ml de EBH contiene 5 mg de hipófisis completas. 1 ml de solución GnRH tiene $4,2 \mu\text{g}$ acetato de buserelina ml^{-1} . El grupo control fue inyectado con solución fisiológica estéril.

No se realizó muestreo de gónadas con la intención de que los animales sean parte del plantel de reproductores después de la experiencia.

Determinación del sexo. En los dos últimos experimentos, las hembras y los machos fueron identificados mediante ecografía con transductor plano de 5,5 MHz (Berger LC2010, Berger, Buenos Aires, Argentina), según Rotta et al. (2007). Se utilizó esta técnica no invasiva, con la intención de preservar los animales para conformar un plantel de reproductores.

Variables reproductivas evaluadas. Se registró el índice gonadosomático (IGS) en ambos sexos calculado con la fórmula, $IGS = PG/PT \times 100$ (cita), donde PG= peso de la gónada y PT= peso total (França 2010). PG y PT se determinaron con balanza Kalstein YR05595 (capacidad mín. 0,05 g; máx. 310 g; precisión 0,01 g). Además, en las hembras se evaluaron las siguientes variables: a) se midió el diámetro de 10 ovocitos por hembra, previamente sumergidos en solución de Gilson (5 ml de alcohol al 60%, 44 ml de agua destilada, 0,7 de ácido nítrico al 80%, 1 g de cloruro de mercurio y 0,9 ml de ácido acético glacial); b) se calculó el porcentaje de ovocitos con vesícula germinal en posición periférica (%OVGPP) mediante la observación de 25 ovocitos de cada hembra, previamente sumergidos en solución de Serra (60 ml de alcohol 90%, 30 ml de formaldehído 38% y 10 ml de ácido acético glacial). Los análisis del diámetro de los ovocitos y el %OVGPP se realizaron utilizando un microscopio óptico a 40X. Cuando se obtuvieron ovocitos después del masajeo abdominal de los reproductores, se intentó la fertilización de los mismos. Los ovocitos y el semen obtenidos en seco, se mezclaron dentro de una caja de Petri y se les agregó agua inmediatamente después, manteniéndolos luego en movimiento y con aireación hasta comprobar divisiones celulares.

En los machos, se evaluaron la motilidad y la concentración espermáticas. La motilidad se estimó según (Felizardo et al. 2010). El semen se observó con un microscopio óptico (OlympusR CX-31) a 40X, inmediatamente después de obtenido, activado con agua destilada en proporción 1:4 (semen:agua). La concentración

espermática (N° espermatozoides ml⁻¹) se evaluó en una solución compuesta por 10 μ l de semen con 990 μ l de citrato de formalina (2,9 g de citrato de sodio, 4 ml de solución de formaldehído al 38% y agua destilada c.s. 100 ml). La concentración de espermatozoides se estimó utilizando una cámara de Neubauer con 10 μ l de semen disueltos (Felizardo et al. 2010).

Análisis estadístico. Los resultados se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) ($p < 0,05$) y las diferencias significativas ($p < 0,05$) para cada variable medida entre los grupos se evaluaron con una prueba post hoc de Tukey. Todos los análisis se realizaron utilizando el software JMP, versión 5.1.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

RESULTADOS

Experimento 1: inducción hormonal con EBH. Con IC-I de 1 semana, la inducción hormonal con EBH produjo algunos cambios en las variables reproductivas registradas en todos los animales de los grupos tratados.

El %OVGPP medio fue significativamente mayor en los grupos tratados con EBH que en el grupo control (Figura 1A). El diámetro de los ovocitos también mostró diferencias significativas entre estos grupos (Figura 1B). Por el contrario, el IGS no presentó diferencias significativas entre grupos, pero fue ligeramente superior en el grupo EBH12 (Figura 1C). Se pudieron extraer ovocitos con éxito de dos hembras del grupo EBH12.

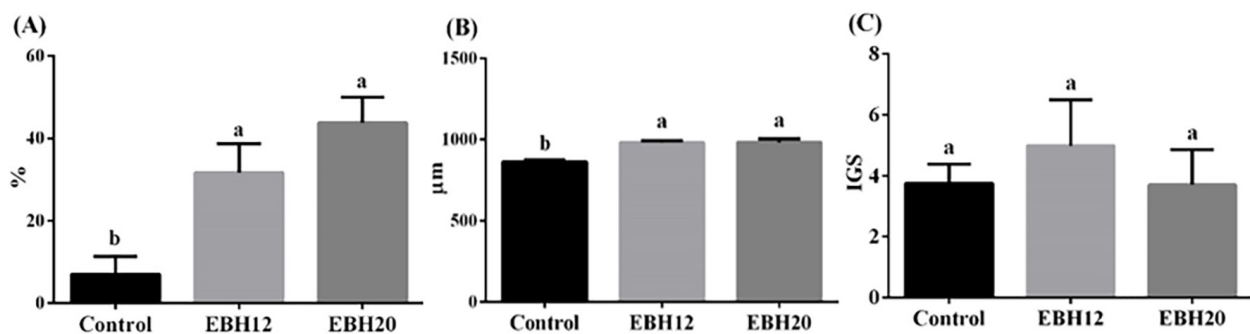


Figura 1. Valores medios (\pm SEM) de las variables evaluadas en hembras de *Gymnotus* sp. A. Porcentaje de ovocitos con

vesículas germinales en posición periférica (%OVGPP). B. Diámetro del ovocito. C. Índice gonadosomático (IGS). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

Sólo se pudo extraer semen a los machos inducidos con EBH y, por lo tanto, la concentración y la motilidad espermáticas pudieron registrarse en los especímenes de los grupos con tratamiento hormonal. En este análisis, no

se observaron diferencias significativas en ambas variables evaluadas entre los machos tratados con EBH (Figura 2A,B). El promedio de motilidad espermática fue superior al 90% para ambos tratamientos (Figura 2B). Tal como se describió en las hembras, el IGS en los machos del grupo EBH12 fue ligeramente superior al de los otros grupos, pero estas diferencias no fueron significativas ($p < 0,05$) (Figura 2C).

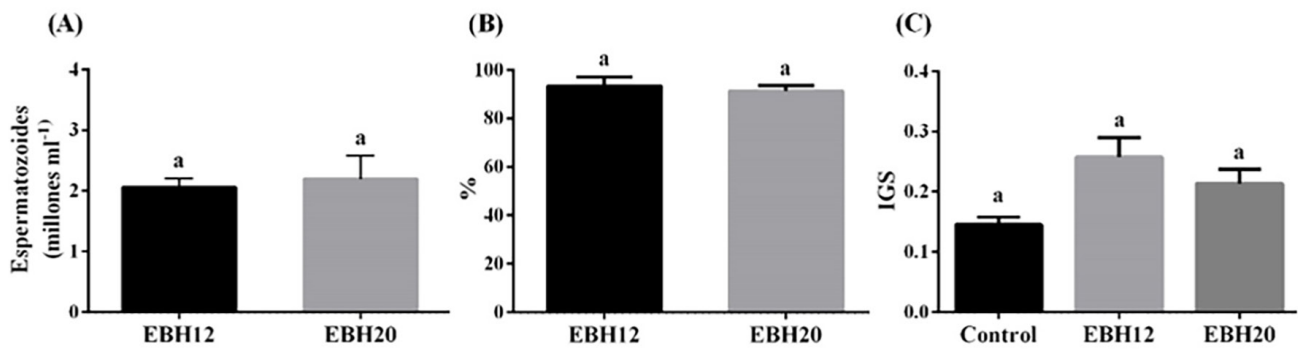


Figura 2. Valores medios (\pm SEM) de las variables evaluadas en machos de *Gymnotus* sp. A. Concentración espermática. B. Motilidad espermática. C. Índice gonadosomático (IGS). Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$).

Experimento 2: inducción hormonal con GnRH sintética. La inducción con GnRH no logró cambios en las gónadas relacionados a la actividad reproductiva ya que, no se pudo obtener gametos luego del masajeo abdominal de las hembras ni de los machos, después de 16 semanas de IC-I.

Experimento 3: inducción hormonal con EBH y GnRH sintética en combinación con el manejo de las condiciones ambientales. Tanto la administración de EBH como la de GnRH con 8 semanas de IC-I y el manejo de variables ambientales, no permitieron la obtención de gametos en ninguno de los sexos. La reducción de la conductividad del agua antes de la inducción hormonal fue entre 25 y 29 $\mu\text{S cm}^{-1}$, lo que representó una disminución cercana al 30% en comparación con el inicio del ensayo.

DISCUSIÓN

La identificación de reproductores maduros es la clave que posibilita el manejo en la reproducción artificial de especies de peces para cultivo. La reproducción inducida con hormonas es una ventaja estratégica para el control del ciclo productivo. Sin embargo, en condiciones de cultivo, los factores ambientales pueden no activar el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas o el estímulo puede ser insuficiente para la culminación del proceso reproductivo según el ciclo de vida de la especie (Zohar y Mylonas 2001).

Aunque los peces de ambientes lénticos como *Gymnotus* sp. no necesitan inducción hormonal para desovar, requieren condiciones ambientales similares a la naturaleza. La reproducción inducida con hormonas podría contribuir a la optimización de la producción de semillas mediante el control de la maduración de los reproductores y la puesta, así como, la manipulación del período reproductivo (Andrade y Yasui 2003).

Los tratamientos hormonales para la reproducción artificial estimulan la maduración de los ovocitos cuando han terminado su desarrollo. Luego, el ovocito se liberará en la luz del ovario (Valdebenito 2008). El proceso de ovulación coincide con la migración del núcleo a la periferia del citoplasma y la fusión de la membrana nuclear al micrópilo (Barnabé 1996).

Algunas de las variables analizadas denotaron cambios tras la inducción con EBH. En el primer experimento, el uso de EBH aumentó el %OVGPP en ambos grupos

tratados en relación al grupo control. Pardo-Carrasco et al. (2006) reportaron resultados similares en hembras de *Brycon amazonicus* inducidas con EBH de carpa. Esto podría estar asociado al progreso de la maduración en el proceso ovulatorio después de la inyección de EBH. Sin embargo, en *Gymnotus* sp. la ovulación solo ocurrió en dos casos durante este experimento.

Aunque hubo diferencias intraespecíficas, el diámetro del ovocito también se vio afectado por la administración de EBH ya que, las hembras inyectadas mostraron valores medios más altos que las hembras del grupo control. Zanuy et al. (2009) sugirieron que el volumen de los ovocitos aumenta debido a la acumulación de vitelo durante el crecimiento secundario del folículo ovárico. Pardo-Carrasco et al. (2006) reportaron resultados similares en otro estudio comparativo de tratamientos hormonales con EBH y GnRH-a en hembras de *B. amazonicus*.

Los valores de IGS registrados indicaron que todas las hembras estaban en maduración o etapa madura de acuerdo con González et al. (2001) y Silva et al. (2003). A diferencia de las dos variables descritas anteriormente, el IGS no mostró diferencias significativas entre las hembras tratadas y las hembras control. Asturiano et al. (2002) describieron un aumento significativo de IGS en hembras de *Anguilla anguilla* inyectadas semanalmente con EBH y hCG de salmón durante 4 meses. Presentaron un valor de IGS de 1% al inicio y entre 20 a 25% al final del experimento. Las diferencias observadas en *Gymnotus* sp. sugieren que las dosis de EBH y los tiempos utilizados durante este trabajo pueden inducir cambios celulares en los ovocitos sin modificar el peso ovárico. Los resultados en machos de *Gymnotus* sp. fueron similares ya que no se observaron variaciones en el IGS entre grupos. Los valores de IGS en machos concuerdan con resultados previos en esta especie, correspondientes a un estadio gonadal de maduración avanzada (Ishiba et al. 2009). Resende et al. (2006) sugieren que las especies de peces que presentan desove parcial de grupos reducidos de ovocitos en nidos, como *Gymnotus* sp., comúnmente no producen semen en gran volumen. Por lo tanto, los machos tienen testículos poco desarrollados y muestran valores de IGS más bajos que especies con otras estrategias reproductivas.

En nuestro estudio, solo se pudo extraer semen con éxito de los machos que fueron inducidos con EBH. La motilidad espermática promedio se consideró adecuada,

con valores superiores al 90% en ambos tratamientos. Se describieron resultados similares en otros estudios que utilizaron EBH para la inducción (Murgas et al. 2004, Shaliutina et al. 2012). Streit-Jr. et al. (2008) reportaron una reducción de la motilidad espermática usando EBH en *Leporinus elongatus* con 53,72% y 36,72%, antes y después de la inducción hormonal, respectivamente.

La concentración de espermatozoides es un parámetro importante para cuantificar la viabilidad del éxito de la reproducción inducida de peces (Streit-Jr. et al. 2008). La concentración espermática media estuvo entre 2 y $2,2 \times 10^9$ espermatozoides ml^{-1} . Este valor fue inferior a la concentración mínima descrita para peces de agua dulce brasileños con tratamiento hormonal $4,4 \times 10^9$ espermatozoides ml^{-1} presentados en *Leporinus macrocephalus* (Viveiros y Godinho 2009). El ambiente de reproducción podría ser la razón de este hecho, ya que todas las especies dulceacuícolas brasileñas descritas son reófilas y desovan huevos pelágicos, mientras que *Gymnotus* sp. es lenítica y posee huevos adherentes (Vazzoler 1996, Kirschbaum y Wiczorek 2002). El tamaño y el número de espermatozoides se correlacionan con el número de huevos y la turbulencia del agua que genera desplazamiento de los mismos en el momento de la reproducción (Liao et al. 2018).

Muchas especies pueden presentar importantes disfunciones reproductivas en condiciones de cautiverio. Es común que las hembras comiencen el desarrollo gonadal pero no lleguen a la maduración final, ovulación y/o desove. Por otro lado, los machos son más resistentes al estrés causado por las condiciones ambientales de cultivo pero producen un menor volumen o mala calidad de semen (Mylonas et al. 2010)

El IC-I prolongado de 8 y 16 semanas parece afectar la respuesta a la inducción hormonal de la reproducción artificial en *Gymnotus* sp. en condiciones de laboratorio. No pudimos obtener resultados positivos usando EBH y GnRH en ninguno de los casos.

De Souza y de Andrade (1984) informaron sobre la reabsorción de ovocitos después de la captura de peces silvestres durante el período de adaptación. Este efecto parece coincidir con el incremento del IC-I que podría bloquear la inducción hormonal efectuada en la reproducción en condiciones de laboratorio.

La reproducción cíclica de los peces de agua dulce de las regiones templadas está controlada principalmente por el fotoperíodo y/o la temperatura, entre otros factores. Este tipo de reproducción ha sido descrita en muchas especies de peces tropicales de América del Sur, África y el Sudeste Asiático. En esas regiones los ciclos de reproducción demostraron estar relacionados con diferencias entre las estaciones seca y lluviosa (Kirschbaum y Wiczorek 2002).

Diferentes autores (Kirschbaum y Wiczorek 2002, Kirschbaum y Schugardt 2003) han demostrado la influencia de factores ambientales en la maduración y regresión gonadal de diferentes peces tropicales que tienen reproducción cíclica o continua, incluyendo cinco especies de *Gymnotiformes* sudamericanos. La maduración podría inducirse experimentalmente mediante la disminución de la conductividad del agua, el aumento del nivel y la simulación de lluvias. Estas características de las condiciones

ambientales se manifiestan en la estación lluviosa y dan lugar a la inundación de los valles aluviales. La regresión gonadal en esas especies se logró con el aumento de la conductividad utilizado para simular la bajante.

La manipulación de factores ambientales como fotoperíodo, temperatura del agua, salinidad, nivel del agua, sustratos, etc., podría inducir a la reproducción de los peces en cautiverio con frecuencia. Kirschbaum y Wiczorek (2002) reportaron el primer desove de *Gymnotus carapo* en condiciones de laboratorio 125 días después de iniciar la reducción de la conductividad del agua, después de 10 meses de aclimatación, antes del inicio del experimento. Consiguieron una disminución de la conductividad de $80 \mu\text{s cm}^{-1}$ como mínimo, entre picos durante todo el ensayo. Durante el experimento 3 del presente trabajo, logramos una disminución de la conductividad de $26 \mu\text{s cm}^{-1}$ de media; lo cual, podría no ser suficiente para la inducción de la maduración gonadal en *Gymnotus* sp.

CONCLUSIONES

Este trabajo es la primera descripción de los parámetros de calidad del semen en *Gymnotus* sp.






Algunas variables reproductivas mostraron diferencias significativas utilizando EBH 5 mg kg^{-1} con IC-I de 1 semana con reproductores durante el mes de noviembre.

La estimulación con GnRH no dio resultados positivos con las diferentes dosis e IC-I utilizados.

Futuras líneas de trabajo deberán centrarse en la combinación de estrategias de inducción hormonal con EBH y el manejo del medio ambiente para simular las condiciones naturales que previenen la regresión de las gónadas durante un IC-I prolongado.

Agradecimientos. Esta investigación contó con subsidio de la Secretaría de Políticas Universitarias (Argentina) para una pasantía internacional de Pablo A. López en la Universidad Federal de Lavras (Minas Gerais, Brasil) durante el primer experimento. Los investigadores brasileños recibieron el apoyo del Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, la Coordinación para el Perfeccionamiento del Personal de Educación Superior y la Fundación de Apoyo a la Investigación del Estado de Minas Gerais (Brasil).

ORCID

López, P.A.  <https://orcid.org/0000-0002-8297-2262>
 Rodrigues Ferreira Machado, M.  <https://orcid.org/0000-0002-5715-4700>
 de Oliveira Felizardo, V.  <https://orcid.org/0000-0003-2834-7551>
 Murgas, L.D.S.  <https://orcid.org/0000-0002-0066-7505>
 Vigliano, F.A.  <https://orcid.org/0000-0003-3741-9270>

REFERENCIAS

1. Almirón A, Casciotta J, Ciotek L, Giorgis P. Guía de los Peces del Parque Nacional Pre-Delta. 1a. Buenos Aires: Administración de Parques Nacionales; 2008. 303 p.

2. Andrade DR, Yasui GS. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. *Rev Bras Reprodução Anim* [Internet]. 2003; 27(2): 166-72.
3. Asturiano JF, Pérez L, Tomás A, Zegrari S, Jover FJEM. Inducción hormonal de la maduración gonadal y la puesta en hembras de anguila europea *Anguilla anguilla* L., 1758: cambios morfológicos y desarrollo oocitario. *Bol Inst Esp Ocean.* 2002; 18(1-4): 127-37.
4. Barnabé G. CUARTA PARTE: Bases biológicas de la acuicultura de los peces. In: Barnabé G, editor. *Bases biológicas y Ecológicas de la Acuicultura.* ACRIBIA. 1996; p. 536.
5. Barrios CE, López PA, Hernández DR, Roux JP, Santinón JJ, Ortiz JC, Domitrovic, HA, González AO, Sánchez S. Evaluación del cultivo de morena (*Gymnotus* sp.) en sistemas intensivo y semiintensivo. In: III Conferencia Latinoamericana sobre Cultivo de Peixes Nativos III Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos. Lavras (MG, Brasil); 2011.
6. Carrillo MA, Muñoz Cueto S, Zanuy S, Rocha G, Molés M, Bayarri MJ, Piferrer F, Fernández-Palacios H, Izquierdo MS, Cerdà J, Herráez MP, Navas JM, Cañavate JP, Gracia López V, Valdebenito Isler I. La reproducción de los peces: Aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura. Carrillo MA, Espinosa de los Monteros J, Editors. Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura 2009; 718 p.
7. de Souza JR, de Andrade DR. Produção de sarapó *Gymnotus carapo* (Pisces: Gymnotidae) em cativeiro. *Rev Ceres.* 1984; 31(176): 308-9.
8. Díaz NF, Neira R. Biotecnología Aplicada a la Acuicultura I. Biotecnologías clásicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas. *Cien Inv Agr.* 2005; 32(1): 45-59.
9. Felizardo VO, Mello RA, Murgas LDS, Andrade ES, Drummond MM, Rosa PV. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Anim Reprod Sci.* 2010; 122: 259-63.
10. França GF. Caracterização do epitelio germinativo das fêmeas e machos de *Gymnotus* sp., e perfil hormonal durante o ciclo reproductivo (Teleostei, Ostariophysi, Gymnotiformes). Universidade Estadual de Campina; 2010.
11. González A, Roux J, Sánchez S. Evaluación de algunos aspectos biológicos de la morena (*Gymnotus carapo*, Linnaeus 1758). Morfología e histología de ovario. 2001; 38: 4. Available from: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2001/4-Veterinarias/V-038.pdf>
12. Ishiba R, Quagio-Grassiotto I, França GF. Aspectos estruturais do desenvolvimento gonadal e relação gonadossomática de machos e fêmeas ao longo do ciclo reproductivo anual em *Gymnotus* cf. *carapo*. In: XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP. São José do Rio Preto. 2009; p. 09909-18.
13. Kirschbaum F, Wiczorek L. Entdeckung einer neuen fortpflanzungs-strategie bei südamerikanischen Messerfischen (Teleostei: Gymnotiformes: Gymnotidae): maulbrüten bei *Gymnotus carapo*. *Verhalt Aquarien.* 2002; 2: 99-107.
14. Kirschbaum F, Schugardt C. Control of gonadal maturation and regression by experimental variation of environmental factors in the mormyrid fish, *Mormyrus rume probosciostris*. *Environ Biol Fishes.* 2003; 70(3): 227-33.
15. Liao WB, Huang Y, Zeng Y, Zhong MJ, Luo Y, Lüpold S. Ejaculate evolution in external fertilizers: Influenced by sperm competition or sperm limitation? *Evolution* (NY). 2018; 72(1): 4-17.
16. Murgas LDS, Miliorini AB, Franciscatto RT, Alexandre Nízio M. Viabilidade Espermiática do Sêmen de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) Resfriado a 4°C. *R Bras Zootec.* 2004; 33(6): 1361-5.
17. Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *Gen Comp Endocrinol* [Internet]. 2010; 165(3): 516-34.
18. Pardo-Carrasco SC, Arias-Castellanos JA, Suárez-Mahecha H, Cruz-Casallas PE. Inducción a la maduración final y ovulación del yamú *Brycon amazonicus* con EPC y mGnRH-a. *Rev Col Cienc Pec.* 2006; 19(2): 160-6.
19. Resende EK, Pereira RAC, Sório VF, Galvão EM. Biología da tuvira, *Gymnotus* cf. *carapo* (Pisces, Gymnotidae) no Baixo rio Negro, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Biologia* (Bratisl) [Internet]. 2006; 42. Available from: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/812542/1/BP67.pdf>
20. Rotta MA. Aspectos biológicos e reproductivos para a criação da Tuvira (*Gymnotus* sp) em cativeiro-I [Internet]. Documentos. Corumbá; 2004. Available from: [file:///E:/Gymnotus selección/DOC74 Biología tuvira- Rotta M.A.pdf](file:///E:/Gymnotus%20selección/DOC74%20Biología%20tuvira-Rotta%20M.A.pdf)
21. Rotta MA, Pedroso MF, Acorci LC. Determinação do sexo da tuvira *Gymnotus* sp. através da imagem de ultra-som. In: 1º Congresso Brasileiro de Producao de Peixes Nativos de Água Doce. 2007. p. 7.
22. Sampaio Paulino M, Batista Miliorini A, Murgas LDS, Souza Mendonca de Lima F, Felizardo V. Reproductive performance of pacu, piracanjuba and curimba induced by busereline extract. *Bol do Inst Pesca.* 2011; (37): 39-45.
23. Shaliutina A, Dzyuba B, Hulak M, Boryshpolets S, Li P, Linhart O. Evaluation of spermiation indices with multiple sperm collections in endangered sterlet (*Acipenser ruthenus*). *Reprod Domest Anim.* 2012; 47(3): 479-84.
24. Silva A, Quintana L, Galeano M, Errandonea P. Biogeography and breeding in Gymnotiformes from Uruguay. *Environ Biol Fishes.* 2003; 66(4): 329-38.
25. Streit-Jr. DP, Sirol RN, Ribeiro RP, Moraes GV, Vargas LDM, Watanabe AL. Qualitative parameters of the piapara semen (*Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850). *Braz J Biol.* 2008; 68(2): 373-7.
26. Valdebenito I. Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo : una revisión Hormone therapy for the artificial control of sexual maturity in fish culture : a review. *Zool Sci.* 2008; 123: 115-23.
27. Vazzoler AEAM. Biología da Reprodução de Peixes Teleosteos: Teoria e Prática. EDUEM: Maringá. 1996. 169 p.

1. Viveiros ATM, Godinho HP. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: A review. *Fish Physiol. Biochem.* 2009; 35: 137-50.
2. Zanuy S, Carrillo M, Rocha A, Molés G. Regulación y control hormonal del proceso reproductor de los teleósteos. *In: Carrillo Estevez MA, Espinosa de los Monteros J, editors. La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura.* Madrid: Fundación Observatorio Español de Acuicultura. 2009; p. 97-172.
3. Zohar Y, Mylonas CC. Endocrine manipulation of spawning induction in cultured fish from hormone to gene. *Aquac Int.* 2001; 197: 99-136.

Citación recomendada

López PA, Rodrigues Ferreira Machado M, de Oliveira Felizardo V, Murgas LDS, Vigliano FA. Respuesta reproductiva a la inducción hormonal en *Gymnotus* sp. (*Teleostei, Gymnotiformes*). *Rev. Vet.* 2023; 34(2): 61-68. doi: <http://dx.doi.org/>